



FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de química orgánica

Glico-oligoamidas catiónicas para el estudio de la interacción carbohidrato ADN

Memoria para optar al grado de doctor presentada por

ANDREA TALADRIZ SENDER

Directora de tesis: Dra. Cristina Vicent Laso



INSTITUTO DE QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL, CSIC

Madrid, 2015

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Síntesis, Estructura y Propiedades de los Compuestos Orgánicos (SEPCO) del Instituto de Química Orgánica General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), bajo la dirección de la Dra. Cristina Vicent Laso.

El trabajo ha estado financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad , dentro de los proyectos: “La interacción específica de carbohidratos y análogos con receptores biomoleculares. Ácidos nucleicos” (MICINN, CTQ2009-10547) y “RMN y Reconocimiento Molecular. Interacciones proteína-carbohidrato y ácido nucleico-carbohidrato” (MINECO, CTQ2012-32025).

Andrea Taladriz Sender ha sido financiada por:

Beca de Formación de Personal Investigador (FPI). Concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Referencia: BES-2010-034877

Beca de estancia predoctoral asociada a la beca de Formación de Personal Investigador (FPI), en el grupo del Dr. Niklaas Buurma, en la Universidad de Cardiff. Reino Unido. Concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad.

ABREVIATURAS	1
NOMENCLATURA Y NUMERACIÓN	5
SUMMARY	10
RESUMEN	19
1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	31
1.1 Relevancia del carbohidrato en procesos de reconocimiento molecular del ADN	33
1.1.1 Estructura de la doble hélice de ADN y reconocimiento molecular	34
1.1.2 Carbohidratos y reconocimiento molecular	38
1.1.2.1 Interacciones CH- π	40
1.1.2.2 Enlaces de hidrógeno y cooperatividad	40
1.1.3 Relevancia del reconocimiento carbohidrato-ADN	42
1.2 Antecedentes	47
1.3 Diseño del nuevo vector catiónico	59
1.4 Introducción de carbohidratos con centros cooperativos de enlace de hidrógeno	62
1.5 Objetivos	63
2. CAPÍTULO 2: SÍNTESIS DE NUEVAS GLICO-OLIGOAMIDAS CATIÓNICAS	67
2.1 Introducción	69
2.1.1 Síntesis de oligoamidas heteroaromáticas	69
2.1.2 Antecedentes: síntesis de glico-oligoamidas neutras	71
2.2 Diseño y síntesis de glico-oligoamidas catiónicas	73
2.2.2 Síntesis de las glicosilaminas 20A-C	76

2.2.2 Síntesis del pirrol de partida 17	79
2.2.3 Síntesis de la hebra indol 11 , Ind-Py-COOH	79
2.2.4 Síntesis de las hebras carbohidrato 27A-C	82
2.2.5 Síntesis de las glico-oligoamidas catiónicas finales	87
2.2.6 Síntesis de la glico-oligoamida neutra de D-xilosa	90
2.2.7 Síntesis de los modelos hebra carbohidrato	91
2.3 Conclusiones	92
2.4 Experimental section	94
3. CAPÍTULO 3: ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES CONFORMACIONES Y DE INTERACCIÓN CON ADN DE LA GLICO-OLIGOAMIDA NEUTRA Y DE LA GLICO-OLIGOAMIDA CATIÓNICA	115
3.1 Introducción	117
3.2 Estudio de solubilidad comparativo entre las glico-oligoamidas neutras y las cargadas	117
3.3 Estudio conformacional en agua de las glico-oligoamidas neutra y catiónica derivadas de xilosa	121
3.3.1 Asignación del espectro ^1H -RMN de las glico-oligoamidas de D-xilosa neutra (1) y cargada (2) en disolución acuosa	122
3.3.2 Estudio conformacional de la glico-oligoamida catiónica de xilosa 2	128
3.3.2.1 Estudio comparativo de los desplazamientos químicos de ^1H -RMN de la glico-oligoamida catiónica (2) y de su mitad carbohidrato (5)	128
3.3.2.2 Caracterización de la conformación plegada de β -D-Xil-Py- $\gamma[(\text{R})\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind (2)	131
3.3.2.3 Experimentos de temperatura variable en H_2O : acetona	136

(90:10)	
3.3.3 Conclusiones del estudio conformacional en agua de la glico-oligoamida catiónica de xilosa	139
3.4 Experimentos de interacción con polímeros de ADN mediante ^1H -RMN	141
3.4.1 Estudios de interacción de β -D-Xil-Py- $\gamma[(\text{R})\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind (2) con polímeros de ADN	142
3.4.1.1 Estudios de interacción de β -D-Xil-Py- $\gamma[(\text{R})\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind (2) y su análoga neutra β -D-Xil-Py- γ -Py-Ind (1) frente a Poly(dA-dT) ₂	145
3.4.1.2 Experimento de competición entre β -D-Xil-Py- $\gamma[(\text{R})\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind (2) y su análoga neutra β -D-Xil-Py- γ -Py-Ind (1) frente a Poly(dA-dT) ₂	148
3.4.1.3 Estudio de la selectividad de secuencia de β -D-Xil-Py- $\gamma[(\text{R})\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind (2)	151
3.4.1.4 Experimento de competición entre β -D-Xil-Py- $\gamma[(\text{R})\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind (2) y netropsina frente a poly(dA-dT) ₂	152
3.4.2 Caracterización de la conformación de β -D-Xil-Py- $\gamma[(\text{R})\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind (2) en el estado asociado con poly(dA-dT) ₂ y Poly(dG-dC) ₂	154
3.4.2.1 Experimentos de efecto Overhauser nuclear transferido (tr-NOE)	154
3.4.2.2 Experimentos Differential-Frequency Saturation Transfer Difference (DF-STD)	161
3.5 Conclusiones	171
3.6 Experimental section	173
3.6.1 General	173
3.6.2 Solubility assay	173

3.6.3 Sample preparation for NMR experiments	174
3.6.4 NMR structural studies	175
3.6.5 NMR interaction studies	175
4. CAPÍTULO 4: GLICO-OLIGOAMIDAS CATIÓNICAS CON CARBOHIDRATOS CON CENTROS DADORES DE ENLACE DE HIDRÓGENO	179
4.1 Introducción y antecedentes	181
4.2 Estudios conformacionales de las glico-oligoamidas catiónicas que contienen D-manosa (3) y L-manosa (4) en el estado libre en agua: determinación de la conformación de horquilla y caracterización del enlace de hidrógeno intramolecular $\text{NH5} \cdots \text{OH2}$	182
4.2.1 Asignación del espectro ^1H -RMN de las glico-oligoamidas de D-manosa (3) y L-manosa (4) catiónicas en disolución acuosa a 25 °C y a -15 °C	183
4.2.1.1 Asignación de los espectros ^1H -RMN de 3 y 4 en D_2O a 25 °C	183
4.2.1.2 Asignación de los espectros ^1H -RMN de 3 y 4 en H_2O /acetona a -15 °C (90:10)	186
4.2.2 Estudio conformacional para la determinación de la estructura de horquilla de las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa (3) y L-manosa (4)	190
4.2.2.1 Estudio comparativo de los desplazamientos químicos de RMN de las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa (3) y L-manosa (4) con respecto a su hebra carbohidrato (6)	191
4.2.2.2 Estudios de temperatura variable H_2O : acetona- d_6 (90:10)	196
4.2.2.3 Caracterización de la conformación plegada de las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa (3) y L-manosa (4) mediante experimentos NOESY	198
4.2.2.4 Conclusiones del estudio conformacional en agua de las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa (3) y L-manosa (4)	206

4.2.3 Caracterización de los enlaces de hidrógeno intramoleculares glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa (3) y L-manosa (4) por RMN	207
4.2.4 Cálculos teóricos	215
4.3 Estudios de interacción de las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa y L-manosa con polímeros de ADN empleando distintas técnicas biofísicas	222
4.3.1 Estudios de interacción de β -D-Man-Py- γ [(R)NH ₃ ⁺]-Py-Ind (3) y β -L-Man-Py- γ [(R)NH ₃ ⁺]-Py-Ind (4) con polímeros de ADN por ¹ H-RMN	222
4.3.1.1 Estudios de selectividad de secuencia de las glico-oligoamidas catiónicas 3 y 4	222
4.3.1.2 Comparación entre las glico-oligoamidas catiónicas 3 y 4 y sus aálogas neutras	226
4.3.1.3 Experimento de competición de β -D-Man-Py- γ [(R)NH ₃ ⁺]-Py-Ind (3) y β -L-Man-Py- γ [(R)NH ₃ ⁺]-Py-Ind (4) con netropsina frente a poly(dA-dT) ₂	228
4.3.2 Caracterización de la conformación y disposición de β -D-Man-Py- γ [(R)NH ₃ ⁺]-Py-Ind (3) y β -L-Man-Py- γ [(R)NH ₃ ⁺]-Py-Ind (4) en el estado asociado con poly(dA-dT) ₂ y poly(dG-dC) ₂	229
4.3.2.1 Conformación en el estado asociado: experimentos tr-NOESY	230
4.3.2.2 Experimentos Differential-Frequency Saturation Transfer Difference (DF-STD)	234
4.4 Experimentos de calorimetría isotérmica de titulación	240
4.5 Conclusiones	255
4.6 Experimental section	257
4.6.1 Sample preparation for NMR experiments	257
4.6.2 Hydrogen bonding characterization by NMR	257

4.6.3 NMR structural studies	258
4.6.4 NMR interaction studies	258
4.6.2 ITC experimental section	261
5. CAPÍTULO 5: PROCESOS DE AGREGACIÓN SUPRAMOLECULAR DE GLICO-OLIGOAMIDAS CATIÓNICAS EN AGUA	265
5.1 Introducción	267
5.2 Experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS)	269
5.2.1 Efecto de la concentración y monitorización de la formación de los agregados	271
5.2.2 Uso de DMSO como codisolvente y estudio de la influencia del tampón	276
5.2.3 Agregación de los modelos hebra-carbohidrato (β -D-xil-Py- NHAc) y hebra-indol (Ind-Py-COOH)	281
5.2.4 Efecto del pH de la disolución y medida del potencial Z	282
5.3 Microscopía de fuerza atómica	286
5.4 Microscopía electrónica de barrido	290
5.5 Experimentos de RMN: ^1H -RMN y DOSY	291
5.6 Conclusiones	297
5.7 Experimental section	298
5.7.1 Dynamic Light Scattering	298
5.7.2 Atomic Force Microscopy	298
5.7.3 Scanning Electron Microscopy	298
5.7.4 NMR dilution experiment and DOSY	299
6. GENERAL CONCLUSIONS	301

ANEXO CAPÍTULO 4	311
ANEXO CAPÍTULO 5	329

Abreviaturas y acrónimos

A	adenina
ADN / DNA	ácido desoxirribonucleico/ deoxyribonucleic acid
Ac	acetilo
AcO	acetato
AFM	Atomic Force Microscopy
anh.	disolvente anhidro
Ar	arilo, protones aromáticos
ax.	axial
API-ES	atmospheric pressure ionization electrospray
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
bp	pares de bases, base pair
br	broad
C	citosa
°C	grados Celcius (centígrados)
calcd	calculated
Cbz	benziloxycarbonilo
CD	Circular Dichroism/Dicroísmo circular
COSY	Correlated Spectroscopy
ct-ADN	calf thymus AND
d (NMR)	doublet / doblete
dd (NMR)	doublet of doublets/ doblete de dobletes
DF-STD	Differential-Frequency Saturation Transfer Difference
DIPC	diisopropilcarbodiimida
DIPEA	diisopropiletilamina
DLS	Dynamic Light Scattering
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
ec.	ecuatorial
EHs	enlaces de hidrógeno
Elem. Anal.	Elemental Analysis
E.M.	espectrometría de masas
equiv.	equivalent
ESI	electrospray ionization

Et	etilo
FS-ADN	Fish Sperm-ADN
G	guanina
GlcNAc	<i>N</i> -Acetil-D-glucosamina
HBTU	(2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
h	horas
Hp	hidroxipirrol
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	espectrometría de masas de alta resolución "High Resolution Mass Spectrometry"
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Im	imidazol
Ind	indol
<i>i</i> -Pr	isopropilo
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
IR	espectroscopía de infrarrojo
M	molar
Man	manosa
Me	methyl
MeCN	acetonitrile
min	minutes
nOe	efecto nuclear Overhauser
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy mp melting point
MS	mass spectrometry
m/z	mass to charge ratio
PBS	Phosphate Buffer Solution
Ph	fenilo/phenyl
Poly(dA-dT) ₂	Poly(deoxyadenylic-thymidylic) acid sodium salt
Poly(dG-dC) ₂	Poly(deoxyguanylic-deoxycytidylic) acid sodium salt
ppm	parts per million/partes por millón
p.s.i.	pounds per square inch
Py	2-carboxi- <i>N</i> -metil pirrol

py	piridina
Py-NHAc	2-carboxy- <i>N</i> -metil pirrol-4-acetamido
PyBOP	benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato
rto.	rendimiento
¹ H-RMN	resonancia magnética nuclear de protón
¹³ C-RMN	resonancia magnética nuclear de carbono 13
R _F	retention factor
RMN	resonancia magnética nuclear
ROESY	Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy
rt	room temperature
s	singlet (NMR)/singlete RMN
sat.	disolución saturada
SEM	Scanning Electron Microscopy
STD	Saturation Transfer Difference
T	temperatura
t.a.	temperatura ambiente
THF	tetrahidrofurano
TFA	ácido trifluoroacético
TMSCl	trimetilclorosilano
TLC	Cromatografía en capa fina "Thin Layer Chromatography"
T _m	Tiempo de mezcla/mixing time
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
tr-NOESY	transfer NOESY
TSP	trimethylsilyl propanoic acid
UV/Vis	ultravioleta/visible
Xil	xilose
Xyl	xylose
γ	derivado del ácido γ-aminobutírico

Nomenclatura y Numeración

Con objeto de facilitar la lectura de esta memoria, y dada la complejidad a la hora de nombrar muchos de los compuestos, las glico-oligoamidas catiónicas y sus precursores serán nombrados con independencia de las reglas IUPAC. A continuación se definen y describen términos característicos de las glico-oligoamidas empleados a lo largo de toda la tesis.

Fragmento oligoamida: Py- γ [3R(NH₃⁺)]-Py-Ind

El fragmento oligoamida será denominado en ocasiones como vector, y en función del tipo de oligoamida que se trate, será vector neutro o vector catiónico. Para las glico-oligoamidas neutras, aparecerá con la siguiente nomenclatura: Py- γ -Py-Ind; y para las glico-oligoamidas catiónicas, aparecerá como: Py- γ [3R(NH₃⁺)]-Py-Ind.

Se empleará la abreviatura Py para referirse al pirrol, Ind para el indol y fragmento γ para el fragmento derivado del ácido γ -aminobutírico (vector neutro) o 3R,4-diaminobutírico (vector catiónico). El pirrol unido al anillo del indol será nombrado como Py^A y el otro pirrol se denominará como Py^B (Figura 1).

Al ser una estructura formada por varios enlaces amida, se puede establecer una analogía con la nomenclatura empleada en los péptidos. En ocasiones en el texto se hará referencia al carbono terminal y al nitrógeno terminal, que están indicados en la Figura 1.

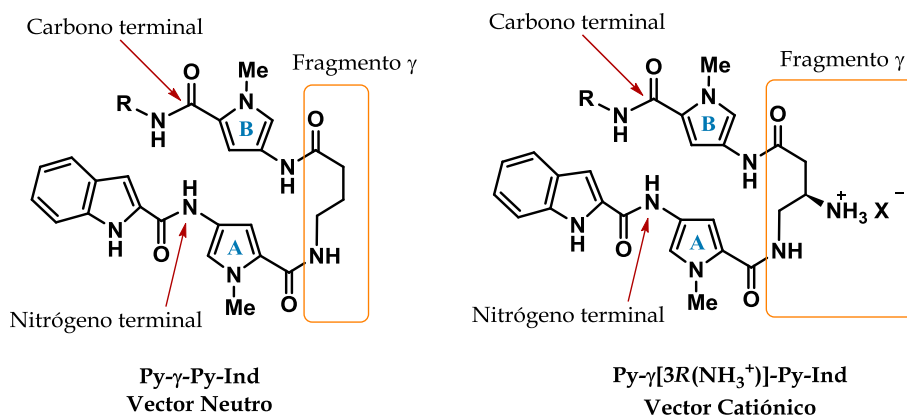


Figura 1 Estructura general del fragmento oligoamida del vector neutro y el vector catiónico.

En la Figura 2, se muestra la estructura general del vector catiónico, con la correspondiente numeración empleada. Debido a la importancia de los NH a lo largo de la tesis, se numerarán, empezando a partir del NH del indol y asignándosele el NH1. La numeración empleada para los átomos, tanto de los pirroles como del indol,¹ será la recomendada por la IUPAC.

¹ Moss, G.P. *Pure Appl. Chem.* **1998**, 70, 143-216.

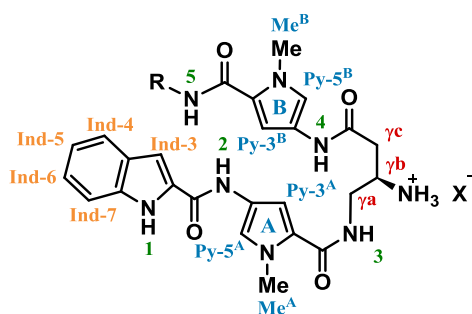


Figura 2 Numeración y nomenclatura de los diferentes protones del fragmento oligoamida catiónico.

En cuanto a la numeración del fragmento γ , en estudios anteriores de las glico-oligoamidas neutras se emplearon las letras a, b y c para referirse a sus protones, y es esta la que se ha mantenido para el vector catiónico también (Figura 3A). No obstante, en algunas ocasiones para este fragmento γ se emplean además otros términos y numeraciones, que se detallan a continuación. Se pueden emplear los términos de sustituciones α , β y γ , respecto de la posición del carbonilo del derivado del ácido diaminobutírico. Por lo tanto, el grupo amino de este fragmento en el vector catiónico, estaría en posición β , respecto del carbonilo (Figura 3B). Por último, atendiendo a la normativa IUPAC, dándole la prioridad al carbonilo de este mismo fragmento, el grupo amino, se encontraría en posición 3 (Figura 3), de ahí la abreviatura empleada en los nombres de los compuestos $\gamma[3R(NH_3^+)]$.

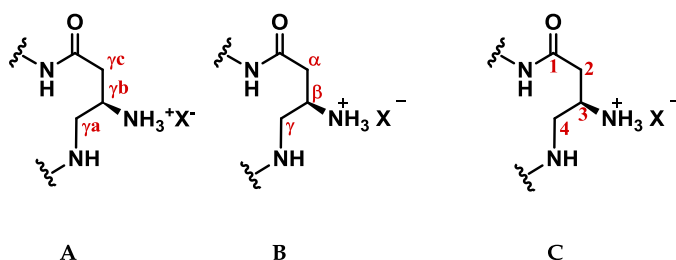


Figura 3 Numeración y nomenclatura para el fragmento γ .

Carbohidratos

En la tesis aparecen carbohidratos tanto de la serie D como de la serie L, y será indicado cuando corresponda en el nombre abreviado. Además, se obtendrán en algunos casos mezclas de anómeros α y β , por lo que también se describirá la configuración del C1. En los casos en los que haya diferentes sustituyentes en el carbohidrato también se indicará. El sustituyente del carbono anomérico (C1) será descrito abreviado al final del nombre dado al compuesto (Figura 4). La numeración empleada para los carbohidratos y sus sustituyentes ha sido elegida siguiendo los criterios de la IUPAC.²

² McNaught, A. D. *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68, 1919-2008.

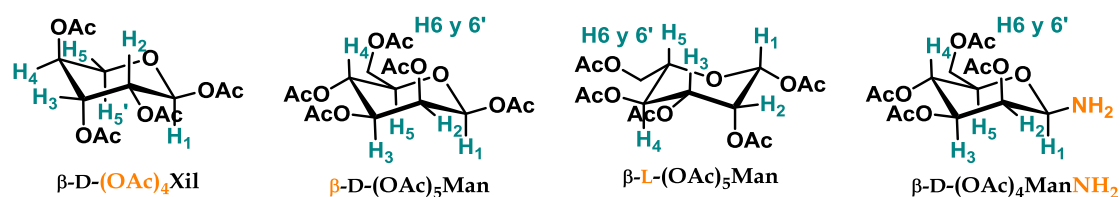


Figura 4 Numeración y nomenclatura de los carbohidratos.

Modelos hebra carbohidrato y hebra indol

Por su diseño y estructura, las glico-oligoamidas catiónicas están constituidas por lo que se han llamado, dos hebras: la hebra indol, que incluye el pirrol A junto con el indol; y la hebra carbohidrato, que está formada por el pirrol B y por el carbohidrato (Figura 5).

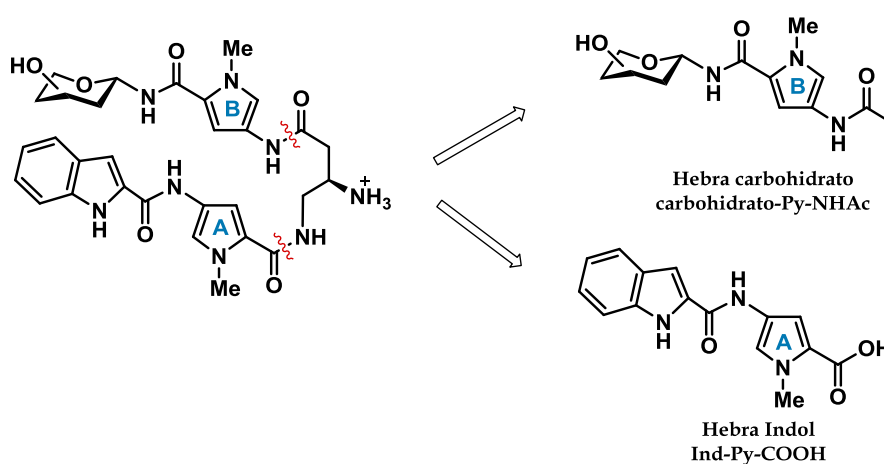


Figura 5 Hebra carbohidrato y hebra indol de las glico-oligoamidas catiónicas.

En los estudios conformacionales por RMN, en concreto en los experimentos NOESY, se hablará en algunos casos de nOes interhebra y nOes intrahebra. Cuando se observen nOes correspondientes a la cercanía espacial entre dos protones cercanos pertenecientes a dos hebras diferentes se denominará nOe interhebra. Si el nOe detectado corresponde a la cercanía espacial entre dos protones pertenecientes a la misma hebra, será un nOe intrahebra.

Summary

The study of basic atomic features of carbohydrate recognition interactions is a topic of current interest. Carbohydrate-DNA recognition is a recent emergent field due to the importance of such an interaction in certain biological systems. Carbohydrates are present in many antibiotics and anticancer drugs that target DNA and, in some cases, sugar residue is responsible for the sequences selectivity of the drug. Additionally, the relevance of carbohydrate-DNA interaction is currently growing with recent advances in glycosciences. The characterization of nuclear glycoproteins that act as transcription factors in which carbohydrate residues act as switches of the glycoprotein function is suggesting the importance of developing chemical tools to shed light on glyco-effects on glycoprotein-DNA interaction. However, the lack of knowledge on basic aspects of the interactions at the origin of selectivity and specificity of carbohydrate-nucleic acid binding makes it difficult to effectively design new carbohydrate-nucleic acid binders.

To fill such knowledge gap, in previous studies our group explored the use of carbohydrate hydrogen bonding cooperativity as a tool to bind carbohydrates to the hydrogen bonding motifs present in DNA grooves with model compounds in apolar solvents. Thus, a complete characterization of sugar hydrogen bonding patterns that bind efficiently to GC base pair and phosphate groups in non-polar solvent was carried out. In order to extend this strategy to natural systems, a neutral vector molecule which was able to bring structurally simple carbohydrates close to a particular DNA sequence was designed. The vector selected as a DNA binder was an oligoamide fragment (Py- γ -Py-Ind), which resembles the structures of the antibiotics Distamycin A and Netropsin (two minor groove binders) and was based on the DNA recognition code developed by Dervan et al. Consequently, the vector structure included side-by-side pairing of pyrrole amino acids (Py) covalently joined head-to-tail by an aminobutyric acid linker (γ). The studied carbohydrate was placed at C-terminal and an indole ring (Ind) was included at the N-terminal, with the aim to drive the conformational equilibrium of the glico-oligoamide towards the folded conformation through CH- π interactions (Figure 1).

Even though we had succeeded in the initial study of carbohydrate-DNA binding with the neutral vector, the need to overcome some limitations of the initial approach emerged. Therefore, the first aim of this thesis was to design a new cationic vector, in order to improve aqueous solubility in comparison to the neutral ligands, improve stability of the complexes formed with DNA as well as their sequence selectivity towards AT/TA base pairs. However, an important issue was to introduce a subtle structure modification since we wanted to keep the main structural features of the former neutral analogue.

According to several studies by Dervan and Sugiyama, selective chiral substitution on specific β position of the γ -aminobutyric acid linker with a cationic group (NH_3^+), enhances the properties of the polyamide hairpins with regard to DNA affinity and

sequence specificity. Hence, we have selected a different γ fragment as a new linker. Aminobutyric acid (γ) was replaced by a (*R*) 3,4-diaminobutyric acid moiety which results in an amine residue at the γ -turn unit (γ [*R*] NH_3^+) (Figure 1). Consequently, the core of the molecule keeps a design comparable to our neutral vector analogue, allowing a comparative study between both types of derivatives, neutral vs cationic. In order to proof effectiveness of the new cationic vector, D-Xylose cationic glyco-oligoamide was synthesized as well as its neutral analogue for comparative reasons.

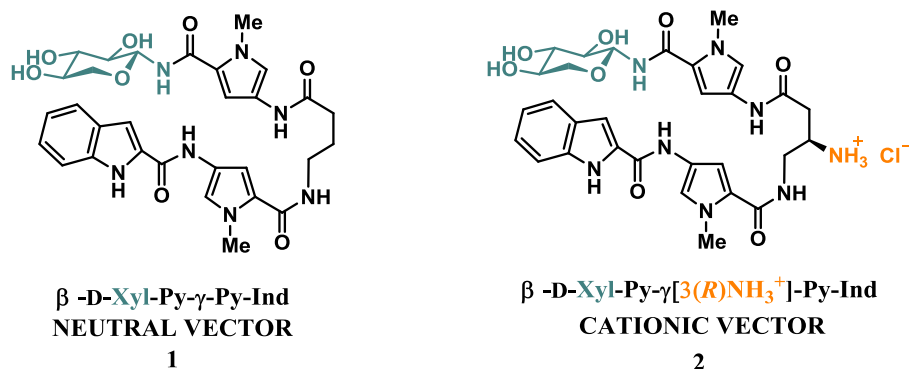


Figure 1 Neutral vector and cationic vector

The second aim of this thesis was the introduction of carbohydrates with cooperative hydrogen bonding centers in the new cationic vector, as a further step in the use of hydrogen bonding cooperativity as a tool in the study of the structural requirements for DNA recognition by sugars in aqueous media. Previous studies of our group have shown how directional intramolecular hydrogen bonds in carbohydrates can be used to strengthen intermolecular hydrogen bonds in apolar media. Our current strategy is to create cooperative hydrogen-bonding centers by using strong and directional intramolecular hydrogen-bonding motifs that could survive in aqueous media. These centers may allow a particular OH group to behave as an efficient cooperative donor motif in an intermolecular process. This design shows a directional five-membered-ring intramolecular hydrogen bond between the amide NH and OH group. In this situation, OH is an acceptor from the amide NH group and should behave as a cooperative donor in an intermolecular process with an external acceptor (Figure 2).

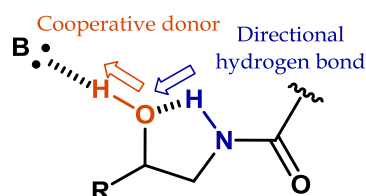


Figure 2 Five-membered-ring intramolecular hydrogen-bond motif to allow intermolecular hydrogen-bonding cooperativity.

Following this pattern, a D-Mannose cationic glyco-oligoamide was designed, with the carbohydrate attached to the oligoamide residue through the anomeric amide (NH) at the β position. In addition, the OH₂ group of the carbohydrate displays an axial

orientation. This positioning of the OH2 and NH5 sets the two residues at hydrogen-bonding distance, so, they are ready to establish an intramolecular hydrogen bond, with the NH5 as the donor and OH2 as the acceptor (equatorial (eq), axial (ax) five-membered-ring hydrogen bond). Additionally, in order to study the influence of carbohydrate chirality in the interaction of cationic derivatives with DNA, L-Mannose cationic glyco-oligoamide was also included in the study (Figure 3). Both diastereomeric derivatives were studied in the free and bound state.

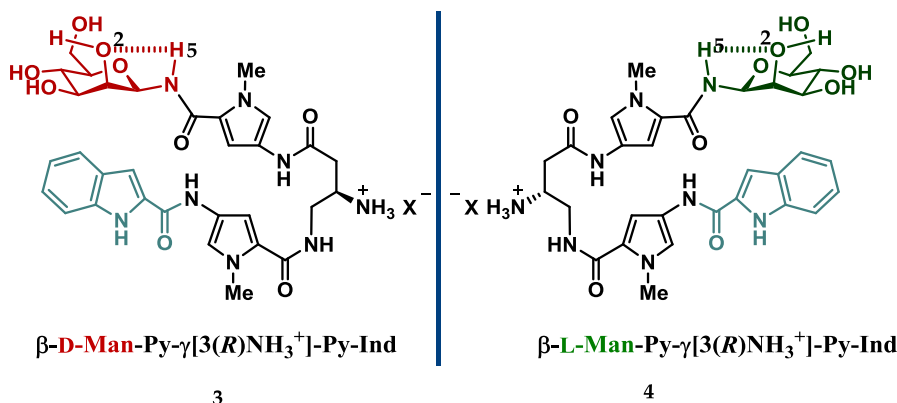


Figure 3 Cationic glyco-oligoamides containing cooperative hydrogen bonding centers

First of all, it was necessary to design and optimize a methodology to synthesize the new cationic glyco-oligoamides. An efficient convergent solution phase synthesis was developed, based on sequential nitro reductions to obtain amines followed by amide bond formation with the corresponding activated acid. Both, indole strand (Ind-Py-COOH) as well as sugar strand with the γ -fragment incorporated (sugar-Py- $\gamma[3(R)\text{NHCbz}]\text{NH}_2$) were synthesized independently, and finally coupled at a late stage. Remarkably, arduous column chromatography at some stages could be avoided, resulting in higher yields. The three new cationic glyco-oligoamides, $\beta\text{-D-Xyl-Py-}\gamma[3(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ (2), $\beta\text{-D-Man-Py-}\gamma[3(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ (3) and $\beta\text{-L-Man-Py-}\gamma[3(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ (4), were synthesized containing just the desired carbohydrate β anomer. Furthermore, neutral derivative $\beta\text{-D-Xyl-Py-}\gamma\text{-Py-Ind}$ (1) was also synthesized in order to be able to compare their properties with the cationic analogue. Finally, the use of this methodology, allow us to obtain the single strand carbohydrate models, D-Xyl-Py-NHAc (5) y D-Man-Py-NHAc (6), which are useful in conformational studies (Figure 4).

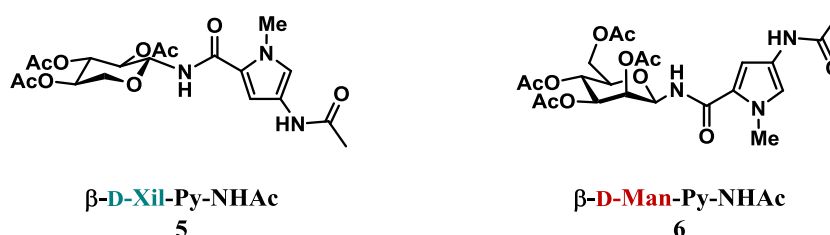


Figure 4 Single strand carbohydrate models

Subsequently, a comparative study between properties of the neutral and cationic glyco-oligoamides was carried out. The first property that was analyzed, it was the thermodynamic solubility in aqueous solution of the new cationic derivatives. Concentration of saturated solutions of cationic β -D-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) and neutral D-mannose (β -D-Man-Py- γ -Py-Ind) derivatives was measured by HPLC. Results have shown that solubility of the cationic derivative is twice the solubility found for neutral analogue, so solubility was improved.

The neutral glyco-oligoamides present in aqueous media a conformational equilibrium between a linear conformer and a hairpin folded conformer. This equilibrium is shifted towards the hairpin conformer, stabilized by π - π interactions between the pyrrole rings and by sugar-indole CH- π interactions, in the case of the neutral derivatives. NMR conformational studies of β -D-Xyl-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) in aqueous solution were carried out, to find if hairpin conformation was also present for cationic derivative. Comparison between ¹H-NMR of β -D-Xyl-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) and β -D-Xyl-Py-NHAc (5), have shown a moderate up-field shifting of the proton signals in the case of the cationic glyco-oligoamide (2), due to the proximity effect of the indole ring on the carbohydrate. NOESY experiments have confirmed the presence of hairpin conformation by means of inter-strand nOes detection between the pyrrole protons of the two different strands. Additionally, crucial intra-strand nOes were found indicating a crescent shape of the hairpin conformation, being defined two different rims: NH rim, delimited by the amide NH present in the molecule and NMe rim, defined by the pyrrole methyl groups (Figure 5).

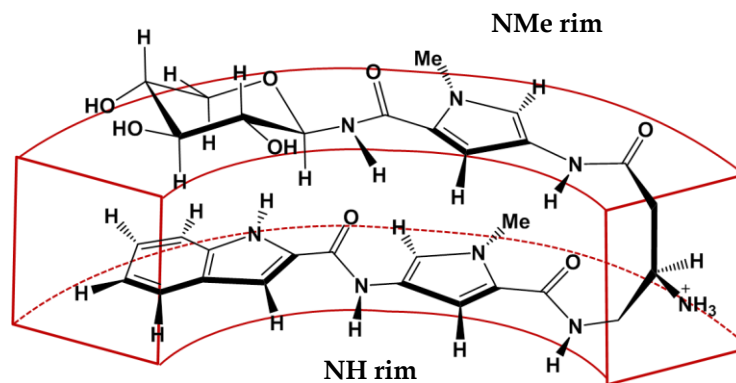


Figure 5 Hairpin conformation adopted by β -D-Xyl-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) in water

Evaluation of DNA interaction properties of the new cationic derivative, β -D-Xyl-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) and the neutral analogue, β -D-Xyl-Py- γ -Py-Ind (1), were performed by ¹H-NMR titration with Poly(dA-dT)₂. As expected, qualitatively, there was a significant affinity difference between both derivatives. New cationic glyco-oligoamide increases binding affinity to Poly(dA-dT)₂, comparing to the neutral ligand. Due to the improved binding affinity, for the first time, it was possible to reach GC sequences with this type of carbohydrate based ligands. Thus, titration of cationic derivative (2) with Poly(dG-dC)₂ was also carried out. The comparison between the two titrations (Poly(dA-dT)₂ and Poly(dG-dC)₂) demonstrated that cationic vector derivative exhibits a preference toward AT sequences.

Structural studies of the Xylose cationic derivative (**2**) complexes with Poly(dA-dT)₂ and Poly(dG-dC)₂ were carried out by ligand-observed NMR methods, i.e. TR-NOESY, DF-STD. Since it was the first time that we were able to study carbohydrate-GC complexes, DF-STD experiment was optimized for complex with this particular DNA sequence. The ligand conformation in both complexes appeared to be quite similar, and at the same time similar to the conformation founded in the free state. A hairpin conformation with a crescent shape defining two rims: NH rim oriented to the inner region of the DNA minor groove, and NMe rim pointing out from the minor groove (Figure 6). Even though, it was not possible to define a specific carbohydrate orientation in the complexes, importantly, in all the cases, the sugar moiety is inside the minor groove, since in the DF-STD experiments there is a saturation transfer to the whole carbohydrate.

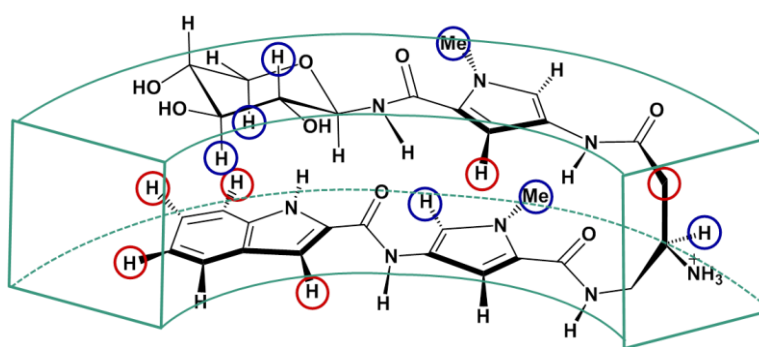


Figure 6 General hairpin conformation in the bound state of β -D-Xyl-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**). Red circles indicate proximity to the inner region of the minor groove and blue circles orientation to the outer region of the minor groove.

These successful results with the new cationic vector were crucial to go a step further in the project. As it was previously mentioned, cationic glyco-oligoamides containing carbohydrates with hydrogen bonding cooperative donor centers, β -D-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) and β -L-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**), were also synthesized. Their conformation in aqueous solution was studied by NMR. Again, a chemical shift ¹H-NMR comparative study was carried out with both mannose derivatives (**3** and **4**) and the corresponding single strand carbohydrate model β -D-Man-Py-NHAc (**6**). In this case, an impressive upfield shifting (>1 ppm) of the ¹H-NMR resonances of the sugar protons located at the α face (H1, H2, and H3) was observed for both diastereomers, **3** and **4**, when comparing to the model compound **6**. This was suggesting the presence of hairpin conformation, but this time carbohydrate orientation could be defined, being the α face towards the indole ring. NOESY experiments of **3** and **4** derivatives in D₂O (25 °C), as well as H₂O/acetone (90:10, -15 °C), confirmed the folded conformation and the specific orientation of carbohydrate α face towards the indole. Inter-strand nOes were detected between carbohydrate α face protons and indole protons, indicating spatial proximity of both strands. Interestingly, these experimental evidences suggested that CH- π interaction could be at the origin of this specific face selection.

Additionally, observed nOes allowed a full description of the predominant fold in aqueous solution of derivatives **3** and **4**. In principle, there are two different folds of the hairpin structure with a specific face (α face) of the carbohydrate (Figure 7). One of them places the sugar centers C2 and C3 oriented towards the NH rim (**B**). Contrary, the other one, places those centers towards the NMe rim (**A**). Experimentally, NMR data (nOe) is in agreement with the presence of a most abundant conformation in solution which corresponds to fold **B** in both diastereomers. Thus, the centers C2 and C3 of the carbohydrate appeared to be towards the NH rim, while C5, C6 and the oxygen from the pyranose ring were in the NMe rim.

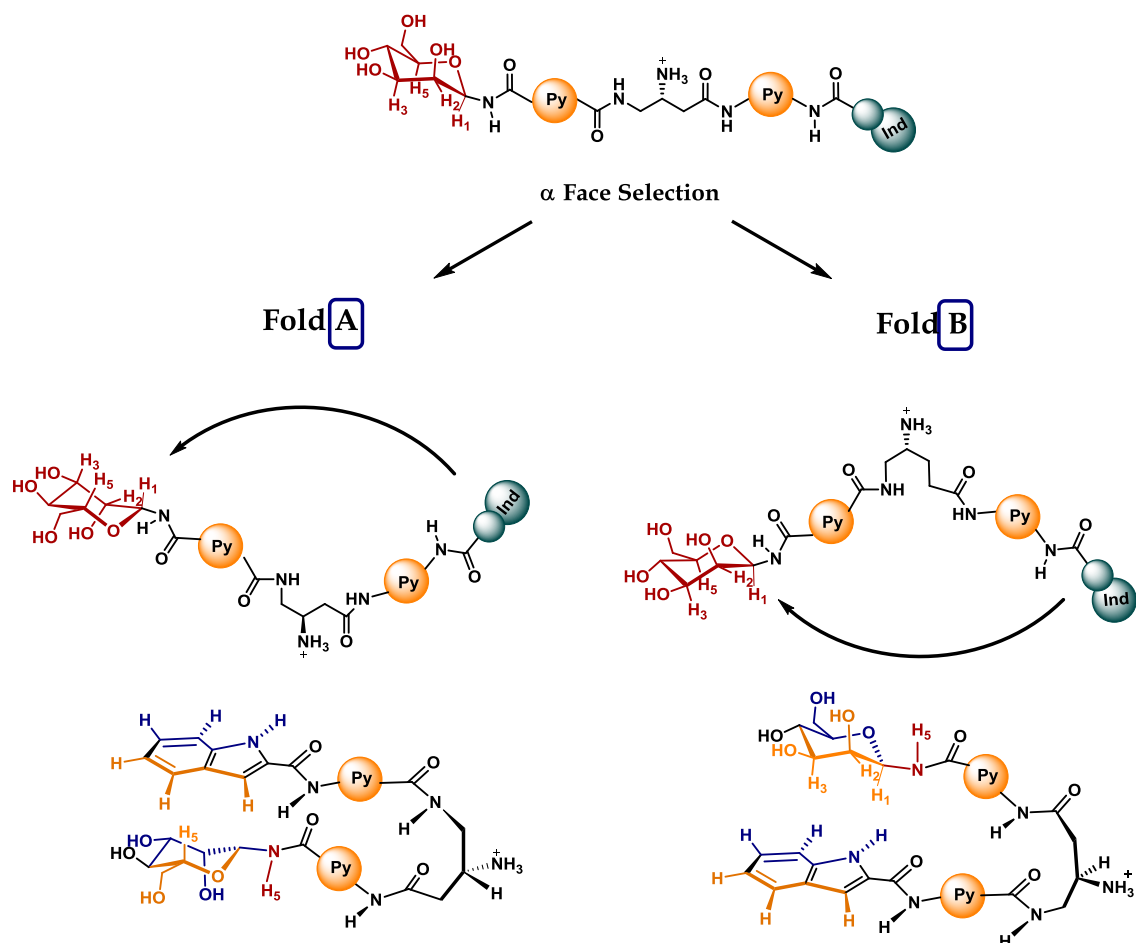


Figure 7 Folding pathways leading to the two possible hairpin fold that can exists in solution with the α carbohydrate face towards the indole ring in the case of β -D-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**).

With the structural data obtained from NOESY experiments, a 3D picture of the two derivatives, **3** and **4**, could be build up. Curiously, since two different carbohydrates enantiomers (D-mannose and L-mannose) have been introduced in the oligoamide vector, for the same experimental data two opposite 3D structures are obtained (Figure 8 and Figure 9). As a consequence, for each case, the NH₃⁺ from γ fragment is pointing out to opposite rims. In the conformation of β -D-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) the NH₃⁺ is oriented to the NH rim while for β -L-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**), the NH₃⁺ is oriented to the NMe rim. Apparently, the

carbohydrate is forcing a certain fold, independently of how the NH_3^+ is finally oriented.

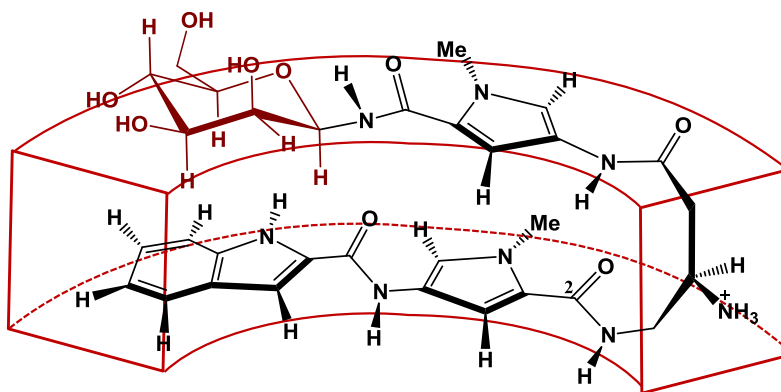


Figure 8 Free state conformation of β -D-Man-Py- γ [3(R) NH_3^+]-Py-Ind (3). Fold B.

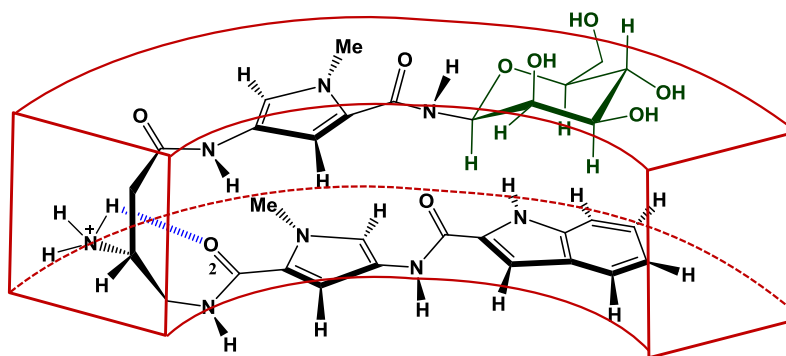


Figure 9 Free state conformation of β -L-Man-Py- γ [3(R) NH_3^+]-Py-Ind (4). Fold B.

DFT theoretical studies carried out in collaboration with Dr. Iñaki Tuñón from Valencia university, have shown an energetic preference towards the fold observed experimentally (**B**) for both cationic glyco-oligoamides **3** and **4**. However, that energetic difference between fold **A** and **B**, is bigger in the L-mannose derivative ($\Delta U = -4.93$ kcal/mol , $\Delta G = -4.69$ kcal/mol), than in the D-mannose analogue ($\Delta U = -0.13$ kcal/mol , $\Delta G = -1.15$ kcal/mol). This fact could be explained because of the formation of an extra hydrogen bond between NH_3^+ and the carbonile group from amide 2 in fold **B** of L-mannose derivative (**4**). Since fold **B** in D-mannose derivative locates the NH_3^+ in the opposite direction, hydrogen bond cannot be generated in this compound. So, the theoretical studies also suggest that is the carbohydrate the one driving the folding of the molecule towards **B** fold.

The next stage in the study of the cationic glyco-oligoamides containing hydrogen bonding cooperative donors was the detection of the exchangeable NH and OH resonances and the characterization of hydrogen bonds in water. The characterization of the possible intramolecular hydrogen bonds was carried out by evaluating the ^1H -NMR data of all the protons, including the exchangeable amide and hydroxy resonances of (**3-4**) and the model compounds (**5**) and (**6**) in aqueous solution at low temperature. Confirmation of the presence of $\text{NH}_5 \cdots \text{OH}_2$ hydrogen bond in water in **3** and (**4**) derivatives was achieved by the measurements of several key NMR

spectroscopic parameters, including temperature coefficients ($\Delta\delta/\Delta T$), vicinal coupling constants ($^3J_{\text{OH,CH}}$) and nOe cross-peaks. Significant low values of temperature coefficients, associated with participation of those centers in a hydrogen bonding presence, were obtained for OH2 and NH5 (Figure 10). Additionally, nOe OH2/NH5 was detected indicating proximity of these two groups. These experimental data strongly suggested the survival of the NH5... OH2 intramolecular hydrogen bond in water in **3** and **4**. However, the comparative study between (**3**) and (**4**), and the carbohydrate model (**6**), shown that hydrogen bond does not survive in water in the case of carbohydrate model (**6**) (Figure 10). This fact suggests the possible CH- π influence on the intramolecular hydrogen bond formation in aqueous media.

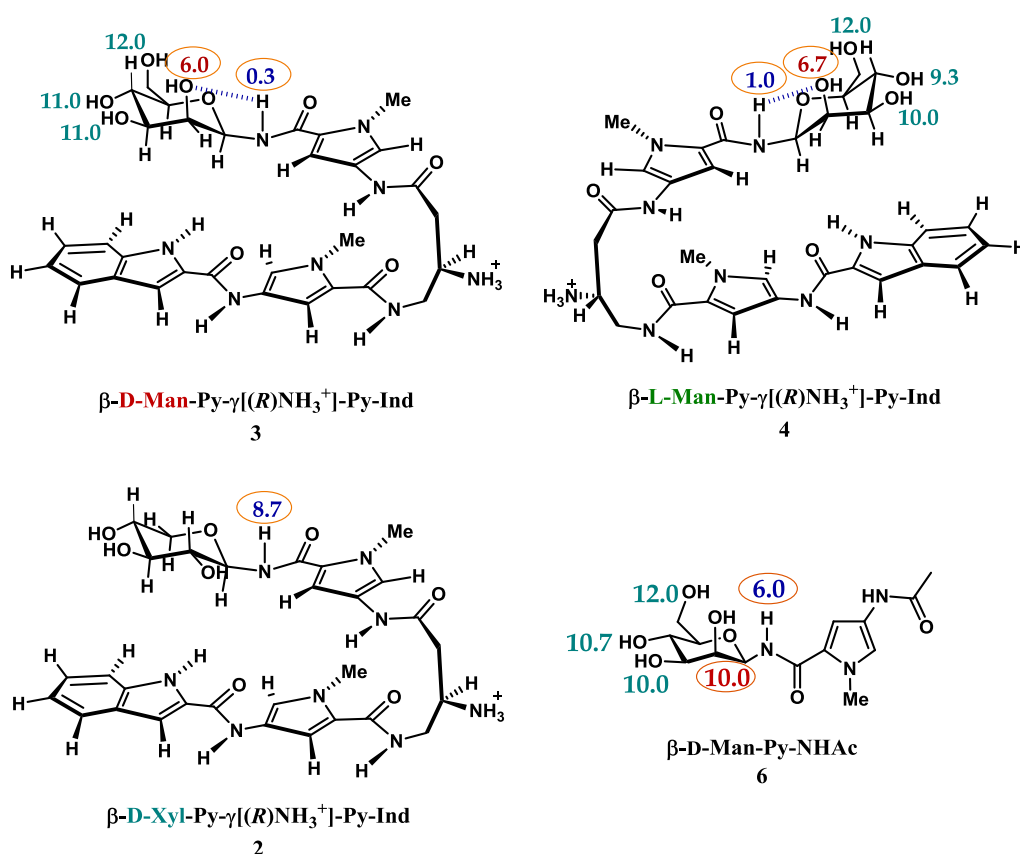


Figure 10 Temperature coefficients of the exchangeable protons from cationic glyco-oligoamide **2-4** and model compound **6**.

Once a full study of the free cationic glyco-oligoamides **3** and **4** was completed, binding affinity studies with DNA polymers (Poly(dA-dT)₂ and Poly(dG-dC)₂) were carried out. The ¹H-NMR titrations revealed that β -L-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**), was the most effective binder, at qualitative level, for both types of DNA sequences, AT and GC. Unfortunately, due to the intermediate-slow exchange regime of cationic glyco-oligoamides with DNA and the increased binding affinity respect to the neutral derivatives, quantification of titration data was not possible.

The interaction properties of these ligands were also studied by ITC in collaboration with Dr. Niklaas Buurma from Cardiff University. A reverse titration methodology was optimized for our system, so we were able to perform interaction

experiments with all the cationic glyco-oligoamides and FS-DNA and Poly(dA-dT)₂. These experiments confirmed the higher affinity of the L-mannose derivative with Poly(dA-dT)₂. The lower affinity of D-mannose ligand did not allow the thermodynamic characterization of its interaction. However, the interaction of L-mannose derivative with Poly(dA-dT)₂ was fully thermodynamically characterized.

Furthermore, looking for a better understanding of the differences found in binding affinity, structural studies of complexes with Poly(dA-dT)₂ and Poly(dG-dC)₂ were carried out by ligand-observed NMR methods, i.e. DF-STD, TR-NOESY. Again, as in the free state, hairpin conformation with orientation of the α sugar face was found in the bound state for all the complexes. On the other hand, DF-STD experiments revealed differences in carbohydrate placement inside the minor groove for the different complexes with different sequences. In the complex of D-mannose ligand with Poly(dA-dT)₂, the possible hydrogen bonding cooperative donor (OH2) could be located towards the inner region of the minor groove. Unfortunately, for L-mannose ligand was not possible to defined an specific orientation inside the groove. For the GC complexes, OH2 from D-mannose (3) derivative is pointing out the minor groove, contrary, same OH2 from L-mannose derivative (4) is oriented towards the inner region of the minor groove being able to participate in an intermolecular hydrogen bonding cooperative process. This structural difference may contribute to variation binding affinities between both ligands with Poly(dG-dC)₂ as it was shown by NMR titration experiments. Additionally, location of NH₃⁺ within the different complexes may have also an impact on binding affinities.

Surprisingly, an aggregation process was found while performing ITC experiments. A slow exothermic process was observed when diluting glyco-oligoamide solution in ITC titrations. On the other hand, dilution experiments were always performed by ¹H-NMR, previously to DNA interaction studies, to exclude the possible influence of self-aggregation in our NMR data. Significant chemical induced shift (≤ 0.036 ppm) that could have been an indication of a self-assembly process in solution was never found along the dilution experiment. As a consequence, the last chapter of this thesis is focused on the study of the unexpected self-assembly process of cationic glyco-oligoamides in water.

Most of the small molecules designed to target DNA possess particular molecular features, e.g. planar aromatic structure, which make them good intercalators or minor groove binders, but which also facilitate self-aggregation in aqueous solution. However not many times this process is mentioned in literature. In order to evaluate aggregation process in the conditions of DNA interaction studies, e.g. working concentrations, use of cosolvents, DLS studies were performed, as well as AFM and SEM experiments to characterized the aggregates. Indeed, high molecular weight aggregates were detected by DLS and some experiments ant different concentration, with different solvent conditions were performed. Also morphology characterization of the aggregates was carried out by AFM and SEM. Even though, aggregates were detected, at the same time, in some of the DLS experiments monomer specie was also found. Moreover,

NMR diffusion experiments were also carried out to demonstrate that all our NMR experimental data is showing the monomer in solution.

The main conclusion of this study was that in aqueous solution there is a dynamic equilibrium between monomer cationic glyco-oligoamides and aggregates. Each species from this equilibrium can be studied depending on the used technique, meaning that monomer in solution is detected by NMR while big aggregates are observed by DLS. Furthermore, AFM and SEM experiments revealed that aggregates have spherical morphology with characteristics corresponding to vesicular architectures. These data would be in agreement with the slow heat release observed in the ITC experiments.

Resumen

El estudio de las características estructurales a nivel atómico que regulan los procesos de interacción de los carbohidratos es un tema de creciente interés. En particular, en las últimas décadas, se ha puesto de manifiesto el reconocimiento carbohidrato-ADN, debido a la importancia de dicha interacción en multitud de sistemas biológicos. Los carbohidratos están presentes en numerosos antibióticos y agentes antitumorales que tienen como diana terapéutica el ADN. En algunos casos, se ha demostrado que el carbohidrato es el responsable de la selectividad de secuencia del fármaco. Al mismo tiempo, recientes avances en glicociencia, como son la caracterización de glicoproteínas nucleares, donde el carbohidrato actúa como regulador de la función proteica, revelan la importancia de la búsqueda de nuevas herramientas para el estudio detallado esta interacción, carbohidrato-ADN. Sin embargo, la falta de conocimiento de los aspectos estructurales básicos que rigen la interacción y que pueden ser el origen de la selectividad y especificidad de la unión carbohidrato-ADN, hace que el diseño de nuevos ligandos eficaces con carbohidratos en su estructura sea una tarea compleja.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación, exploraron el empleo del fenómeno de la cooperatividad de enlace de hidrógeno en carbohidratos en medio apolar, como herramienta para lograr unir carbohidratos a compuestos modelo con motivos de enlace de hidrógeno presentes en los surcos del ADN. De esta forma, se realizó una caracterización de los patrones de enlace de hidrógeno de carbohidratos, que se unían de manera eficiente al par de bases GC y a grupos fosfato gracias a estos enlaces de hidrógeno, en disolventes apolares. Para extender esta estrategia a sistemas más próximos a los biológicos, se diseñó un vector neutro, que era capaz de llevar carbohidratos estructuralmente sencillos a secuencias particulares del ADN. La estructura de este vector, de tipo oligoamida (Py- γ -Py-Ind), se basó en la estructura de los antibióticos distamicina y netropsina (dos ligandos específicos del surco menor del ADN) y en el código de reconocimiento del ADN desarrollado por Dervan y colaboradores. De esta forma, la estructura del vector incluye dos pirroles (Py) enfrentados entre sí, unidos de forma opuesta mediante una molécula de ácido γ -aminobutírico (γ), que actúa como conector. En la posición carbono terminal, se colocó el carbohidrato objeto de estudio y el en nitrógeno terminal un indol (Ind), con intención de que se establecieran interacciones CH- π entre ambos, que dieran lugar a una conformación plegada en forma de horquilla de la molécula en agua.

A pesar de que los estudios iniciales de la unión carbohidrato-ADN con el vector neutro fueron prometedores, surgieron varias limitaciones asociadas con el diseño inicial del vector neutro. Como consecuencia, el primer objetivo de esta tesis, fue diseñar un nuevo vector catiónico, que mejorara la solubilidad de los nuevos compuestos respecto de sus análogos neutros, mejorara la afinidad de estos por el ADN y mantuviera la selectividad de secuencia mostrada por los derivados neutros por los pares de bases AT/TA. Además, se pretendía que la modificación estructural

en el esqueleto general del vector fuese mínima para conservar las principales características del vector neutro inicial.

De acuerdo con estudios de Dervan y Sujiyama, la introducción de un grupo amino protonado (NH_3^+) en la posición β del fragmento γ -aminobutírico, aumentaba la afinidad de las poliamidas por el ADN y también la selectividad de secuencia. Así, se decidió reemplazar el conector γ -aminobutírico, por un derivado del ácido 3R,4-diaminobutírico, que supondría la introducción del grupo amino extra en el fragmento γ (γ [$3(R)\text{NH}_3^+$]). De esta forma, se mantendría el núcleo de la estructura similar al vector neutro, permitiendo realizar un estudio comparativo entre los dos tipos de ligando, el neutro y el catiónico. Para probar la efectividad del nuevo derivado, se diseñó una ruta sintética apropiada para la preparación de la nueva glico-oligoamida catiónica de D-xilosa (**2**). Además por motivos comparativos, también se sintetizó la glico-oligoamida neutra derivada de D-xilosa (**1**) (Figura 1).

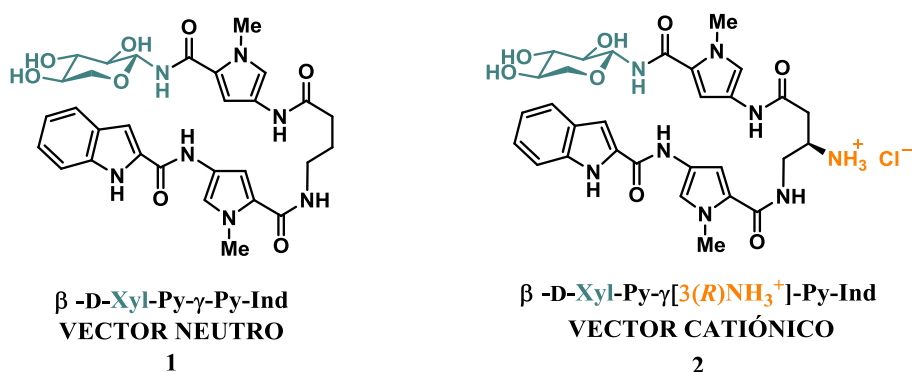


Figura 1 Vector neutro y vector catiónico.

Para dar un paso más en el empleo de la cooperatividad de enlace de hidrógeno como herramienta para el estudio se los requerimientos estructurales que regulan el reconocimiento de carbohidrato-ADN en agua, el segundo objetivo planteado en esta tesis fue la introducción de carbohidratos con centros cooperativos de enlace de hidrógeno en el nuevo vector catiónico. Estudios previos del grupo de investigación, habían mostrado como un enlace de hidrógeno intramolecular unidireccional en el carbohidrato, podía emplearse para fortalecer los enlaces de hidrógeno en agua. Por lo tanto, la estrategia actual es crear centros cooperativos de enlace de hidrógeno mediante la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular fuerte, polarizado en una dirección, que sobreviva en un medio competitivo como es el agua. Estos centros, podrían hacer que un hidroxilo en concreto del carbohidrato, se comportase como un dador cooperativo de enlace de hidrógeno eficiente en un proceso intermolecular. En la Figura 2 se muestra el diseño del motivo de enlace de hidrógeno, donde se formaría un enlace de hidrógeno intramolecular unidireccional entre el NH de la amida y un OH, dando lugar a un anillo de cinco miembros. En esta situación, el OH actuaría como aceptor de enlace de hidrógeno con el NH de la amida, pero a su vez se comportaría como dador cooperativo en un proceso intermolecular, con un aceptor externo.

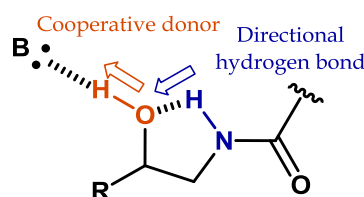


Figura 2 Anillo de cinco miembros intramolecular formado por el enlace de hidrógeno entre el NH y el OH, que podría dar lugar a un proceso cooperativo intermolecular.

Siguiendo este patrón, se diseñó una glico-oligoamida catiónica de D-manosa (**3**), con el carbohidrato unido a través de la amida anomérica en posición β al fragmento oligoamida. Además, el grupo OH2 se sitúa en posición axial. Esta colocación del OH2 y el NH5, sitúa a los dos residuos a una distancia propicia para que tenga lugar el enlace de hidrógeno intramolecular, actuando el NH5 como dador y el OH2 como aceptor. Además, para estudiar la influencia de la quiralidad del carbohidrato en la interacción de los derivados catiónicos con el ADN, también se incluyó en el estudio la glico-oligoamida catiónica de L-manosa (**4**) (Figura 3). Ambos diastereómeros fueron estudiados tanto en el estado libre como en el asociado al ADN.

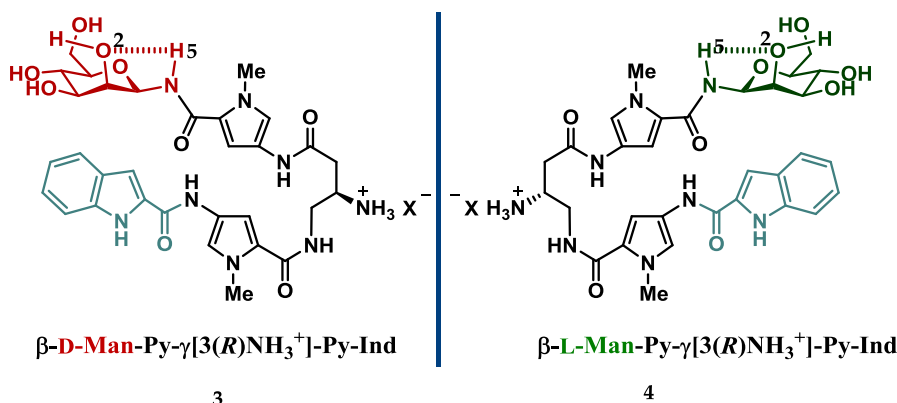


Figura 3 Glico-oligoamidas catiónicas que contienen carbohidratos con centros cooperativos de enlace de hidrógeno.

En primer lugar, fue necesario diseñar y optimizar una metodología para sintetizar las nuevas glico-oligoamidas catiónicas. Se desarrolló una síntesis convergente en disolución eficiente, basada en reducciones del grupo nitro para obtener aminas, que posteriormente hacían reaccionar con los correspondientes ácidos activados para dar lugar a los diferentes enlaces amida. Ambas hebras, la hebra indol (Ind-Py-COOH) y la hebra carbohidrato con el fragmento γ incorporado (azúcar-Py- γ [3(R)NHCBz](NH₂)), se sintetizaron de manera independiente, para unir las mediante la formación del último enlace amida al final de la síntesis. Cabe destacar, que en varias etapas se pudo evitar la purificación mediante arduas columnas cromatográficas, lográndose buenos rendimientos. Las tres glico-oligoamidas catiónicas β -D-Xil-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**), β -D-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) and β -L-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**), se sintetizaron con rendimientos moderados, lográndose aislar el deseado anómero β puro. También se sintetizó el derivado neutro de D-xilosa β -D-Xil-Py- γ -Py-Ind (**1**), para

poder realizar el estudio comparativo con su análogo catiónico. Por último, gracias a la metodología de síntesis desarrollada, se obtuvieron también fácilmente los modelos hebra carbohidrato D-Xil-Py-NHAc (**5**) y D-Man-Py-NHAc (**6**) que resultan de utilidad para los estudios conformacionales (Figura 4).

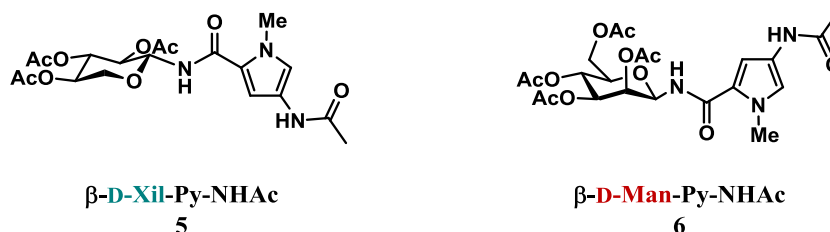


Figura 4 Modelos hebra carbohidrato

A continuación, se llevó a cabo un estudio comparativo de las propiedades del vector neutro y el vector catiónico. En primer lugar, se realizó un análisis para determinar la solubilidad termodinámica en agua de ambos tipos de vector. Para ello, se prepararon disoluciones saturadas de los derivados neutro (β -D-Man-Py- γ -Py-Ind) y catiónico de D-manosa β -D-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**). La concentración de las diferentes disoluciones saturadas fue medida mediante HPLC. Los resultados mostraron que la solubilidad del derivado catiónico es el doble de la obtenida para el derivado neutro, demostrándose así la mejora en la solubilidad.

Las glico-oligoamidas neutras presentan un equilibrio conformacional en disolución acuosa, entre un conformero lineal y un conformero plegado en forma de horquilla. Este equilibrio en agua se desplaza hacia la conformación en horquilla, que se estabiliza gracias a interacciones π - π entre los anillos de pirrol, y por las interacciones CH- π entre el carbohidrato y el indol. Se realizaron estudios conformacionales por RMN de β -D-Xil-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) en agua, para averiguar qué conformación presentan las glico-oligoamidas catiónicas. La comparación de los espectros de ¹H-RMN entre β -D-Xil-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) y β -D-Xil-Py-NHAc (**5**), han mostrado un desplazamiento moderado a campo alto de las resonancias de la glico-oligoamida catiónica (**2**), debido al efecto causado por la proximidad del indol al carbohidrato. Los experimentos NOESY, han confirmado la presencia de la conformación plegada en forma de horquilla, mediante la detección de nOes interhebra entre los protones de los pirroles correspondientes a cada hebra. También se observaron nOes intrahebra indicativos de la curvatura de la molécula formando dos arcos bien definidos diferentes: el arco NH, delimitado por los protones NH presentes en la molécula, y el arco NMe, definido por los metilos de los pirroles (Figura 5).

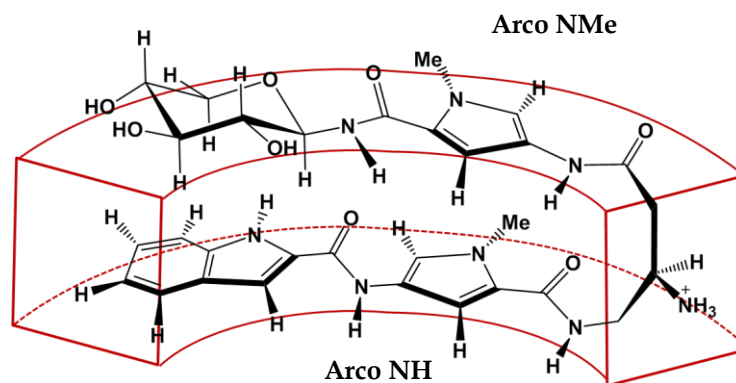


Figura 5 Conformación plegada en forma de horquilla adoptada por β -D-Xil-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) en agua

Para evaluar las propiedades de interacción del nuevo derivado catiónico β -D-Xil-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) y su análogo neutro, β -D-Xil-Py- γ -Py-Ind (1), se realizaron experimentos de titulación ¹H-NMR con Poly(dA-dT)₂. Como se esperaba, se observó de manera cualitativa, una diferencia significativa en la afinidad de ambos derivados por el polímero de ADN. La nueva glico-oligoamida catiónica muestra una afinidad mejorada por el Poly(dA-dT)₂ comparando con su análogo neutro. Debido a esta mejora de actividad, por primera vez, fue posible acercar este tipo de glico-conjugados a secuencias compuestas exclusivamente por GC. De este modo, también se realizó una titulación del derivado catiónico (2) con Poly(dG-dC)₂. La comparación entre estas dos titulaciones de la glico-oligoamida catiónica (2) con Poly(dA-dT)₂ and Poly(dG-dC)₂ demostró que el nuevo vector catiónico, muestra una preferencia por pares de bases AT.

Se realizaron estudios estructurales del nuevo derivado de D-xilosa (2) con Poly(dA-dT)₂ and Poly(dG-dC)₂ (TR-NOESY, DF-STD). Al ser la primera vez que se podían estudiar complejos formados por glico-oligoamidas catiónicas y secuencias GC, se optimizó el experimento DF-STD para este tipo de secuencia. La conformación en el estado asociado parece ser similar a la encontrada para el ligando en el estado libre. De nuevo, una conformación plegada en forma de horquilla con una curvatura que da lugar a dos arcos: el arco NH orientado hacia la región interna del surco menor del ADN, y el arco NMe, orientado hacia la región externa del surco menor del ADN (Figura 6). A pesar de que no fue posible describir una orientación específica del carbohidrato en el complejo, cabe destacar que en todos los casos, el azúcar se encuentra dentro del surco menor, ya que en los experimentos DF-STD se observa transferencia de saturación a todo el carbohidrato.

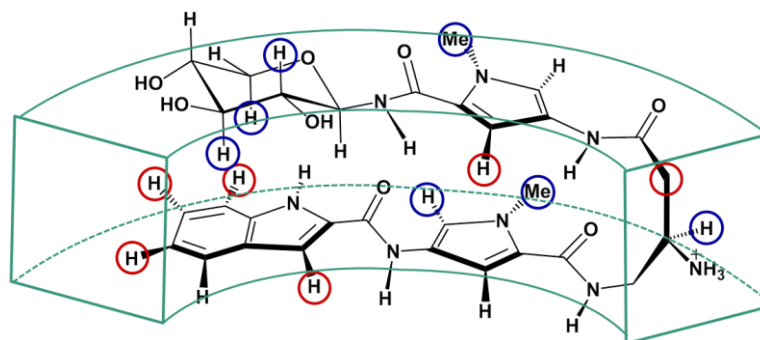


Figura 6 Conformación en horquilla de β -D-Xil-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2). Los círculos rojos indican proximidad a la región interna del surco menor del ADN. Los círculos azules indican proximidad a la región externa del surco menor del ADN.

Los buenos resultados obtenidos con el nuevo vector catiónico permitieron avanzar un paso más en el proyecto. Como se ha mencionado, se sintetizaron glico-oligoamidas catiónicas que contenían carbohidratos con centros cooperativos de enlace de hidrógeno β -D-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) y β -L-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4). Su conformación fue estudiada mediante estudios de RMN en disolución acuosa. De nuevo se realizaron estudios comparativos de ¹H-NMR con los dos derivados catiónicos (3 and 4) y el correspondiente modelo carbohidrato β -D-Man-Py-NHAc (6). En este caso, se observa un marcado desplazamiento a campo alto (>1 ppm) de las señales de resonancia de los protones ubicados en la cara α (H1, H2, and H3) del carbohidrato, en ambos diastereómeros (3 and 4), cuando se compara con el modelo carbohidrato (6). Estos datos sugieren la presencia de la conformación en horquilla, pero en esta ocasión con una definición concreta del carbohidrato, estando la cara α de este orientada hacia al indol. Los experimentos NOESY de los compuestos (3 y 4), tanto en D₂O (25 °C), como en H₂O/acetone (90:10, -15 °C), confirmaron la presencia de cierto porcentaje de conformación plegada con la cara α del carbohidrato orientada hacia el indol. Los nOes interhebra detectados entre la cara α del carbohidrato y el indol, indican cercanía espacial entre ambas hebras. Las evidencias experimentales sugieren, que las interacciones CH- π podrían ser el origen de la selección de cara del carbohidrato.

Asimismo, los nOes observados permitieron realizar una descripción bastante detallada del plegamiento predominante en disolución de los derivados 3 y 4. En principio, hay dos plegamientos diferentes para la conformación plegada con una cara (cara α) específica del carbohidrato (Figura 7). Uno de estos plegamientos, sitúa los centros C2 y C3 orientados hacia el arco NH (B). Por el contrario, el otro plegamiento orienta esos dos mismos centros hacia el arco NMe (A). Experimentalmente, los datos de RMN (nOe) están en concordancia con la presencia de una conformación mayoritaria en disolución que correspondería al plegamiento B para ambos diastereómeros. Así, los centros C2 y C3 del carbohidrato parecen estar hacia el arco NH, mientras que los centro C5, C6 y el oxígeno del anillo de piranosa se sitúan hacia el arco NMe.

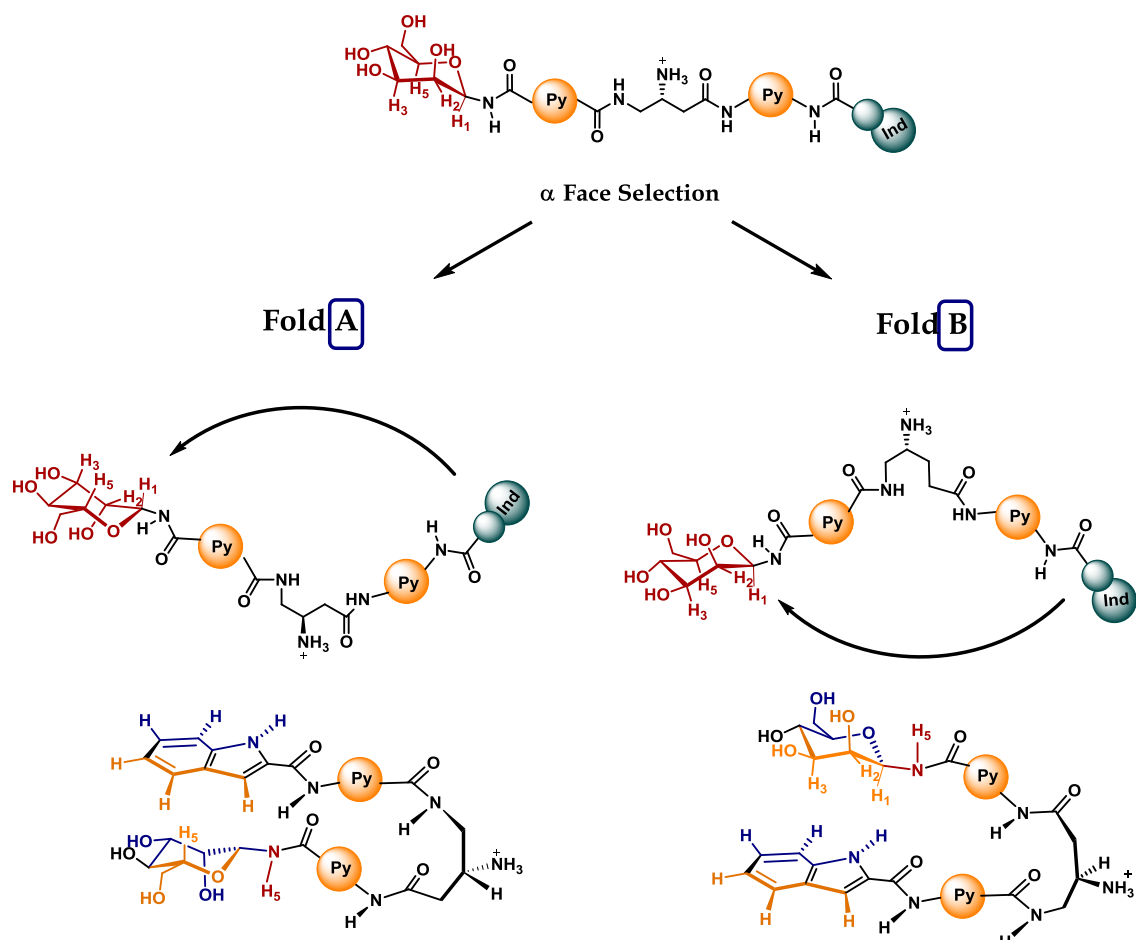


Figura 7 Plegamientos de dan lugar a los dos posibles plegamientos que pueden existir en disolución con la cara α del carbohidrato hacia el indol en el caso de β -D-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3).

Con los datos estructurales obtenidos de los NOESY, se pudo construir una figura 3D de los dos derivados (3 y 4). Curiosamente, debido a la introducción de dos carbohidratos enantiómeros (D-manosa and L-manosa) en el vector oligoamida, para los mismos datos experimentales, se obtienen dos estructuras 3D opuestas (Figura 8 y Figura 9). Como consecuencia, para cada caso, el NH₃⁺ del fragmento γ se orienta hacia direcciones opuestas. En la conformación de β -D-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) el NH₃⁺ se orienta hacia el arco NH, mientras que para β -L-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4), el NH₃⁺ se sitúa hacia el arco NMe. Todo parece indicar, que el carbohidrato está forzando un plegamiento en concreto, independientemente de cómo se oriente el NH₃⁺.

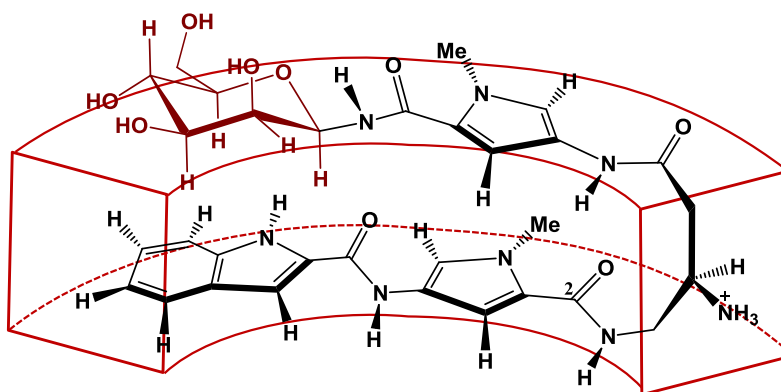


Figura 8 Conformación en disolución acuosa de β -D-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3), plegamiento B.

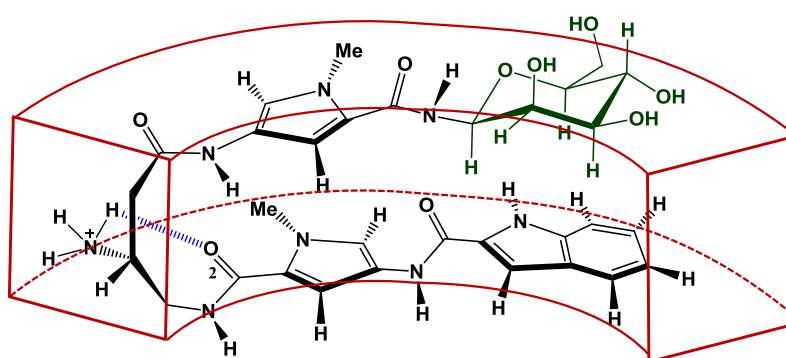


Figura 9 Conformación en disolución acuosa de β -L-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4), plegamiento B.

Estudios teóricos de DFT realizados en colaboración con Dr. Iñaki Tuñón de la universidad de Valencia, han mostrado preferencias energéticas de los plegamientos observados experimentalmente (**B**) frente al otro plegamiento (**A**), para ambas glico-oligoamidas catiónicas (**3** y **4**). Sin embargo, la diferencia energética es mayor para el derivado de L-manosa (**4**) ($\Delta U = -4.93$ kcal/mol, $\Delta G = -4.69$ kcal/mol), que para el derivado de D-manosa (**3**) ($\Delta U = -0.13$ kcal/mol, $\Delta G = -1.15$ kcal/mol). Este hecho se puede explicar en base a la formación de un enlace de hidrógeno extra entre el grupo NH₃⁺ y el carbonilo de la amida 2 en el plegamiento **B** del derivado de L-manosa (**4**). Debido a que en el plegamiento **B** del derivado de D-manosa (**3**), el grupo NH₃⁺ se encuentra en el lado opuesto, el enlace de hidrógeno adicional no se puede formar en ese compuesto. Así, los estudios teóricos también sugieren que es el carbohidrato el que dirige el plegamiento de la molécula hacia el conformero **B**.

El siguiente paso en el estudio de las glico-oligoamidas catiónicas con centros cooperativos de enlace de hidrógeno, fue la detección por RMN de todos los protones intercambiables NH y OH y caracterizar los enlaces de hidrógeno en agua. La caracterización del posible enlace de hidrógeno intramolecular se llevó a cabo evaluando las señales de ¹H-NMR de todos los protones, incluyendo los protones intercambiables NH y OH, de los derivados **3** y **4** y los modelos hebra carbohidrato (**5** y **6**) en agua a baja temperatura. Las medidas de diversos parámetros clave de RMN, como los coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$), las constantes de acoplamiento vecinales

($^3J_{\text{OH,CH}}$) y los nOes permitieron confirmar la presencia del enlace de hidrógeno $\text{NH5}\cdots\text{OH2}$ en agua para los derivados **3** y **4**. Se obtuvieron coeficientes de temperatura bajos, acordes con la participación de esos centros en un enlace de hidrógeno, para el OH2 y el NH5 . Además, se observó un nOe $\text{OH2}/\text{NH5}$, poniendo de manifiesto la cercanía espacial entre estos dos centros. Todos estos datos experimentales, apoyan a la supervivencia del enlace de hidrógeno intramolecular $\text{NH5}\cdots\text{OH2}$ en agua para los derivados **3** y **4**. No obstante, el estudio comparativo de estas dos glico-oligoamidas catiónicas (**3**) y (**4**) con su correspondiente modelo hebra carbohidrato (**6**), apunta a que en el caso del modelo (**6**), el enlace de hidrógeno no persiste en agua (Figura 10). Este hecho sugiere, la posibilidad de que exista una influencia entre las interacciones $\text{CH}\cdots\pi$ y la formación del enlace de hidrógenos en disolución acuosa.

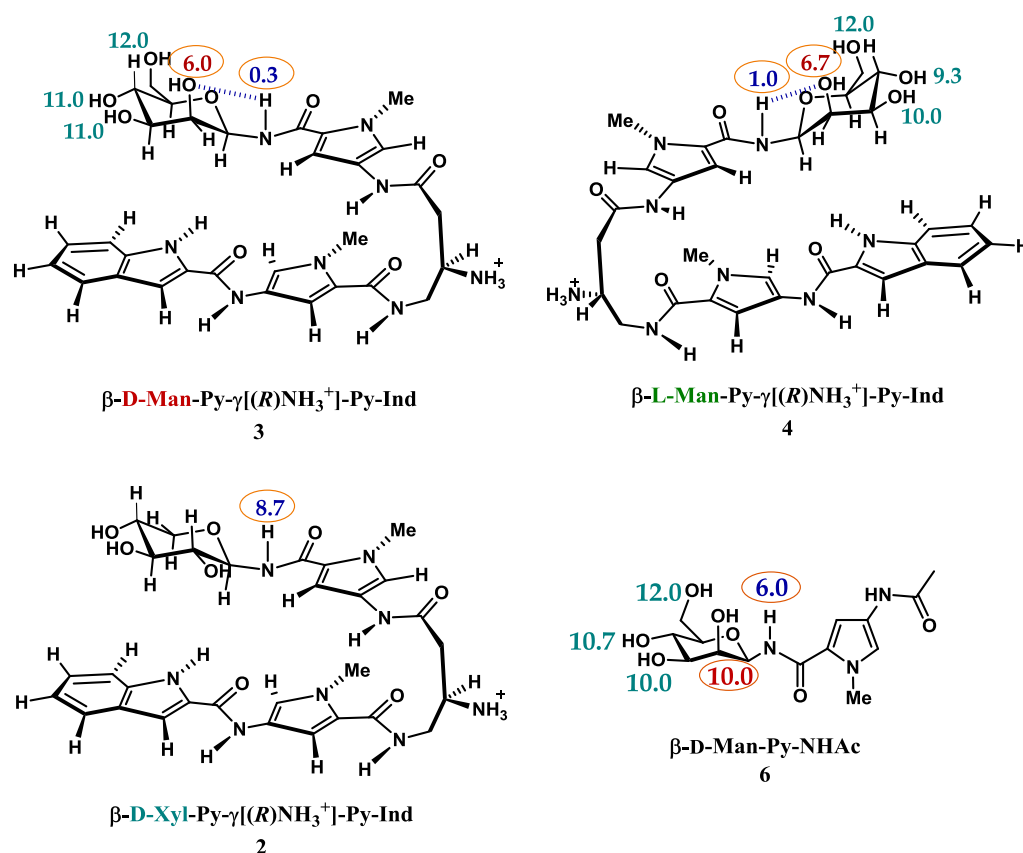


Figura 10 Coeficientes de temperatura de los protones intercambiables de las glico-oligoamidas catiónicas 2-4 y del modelo carbohidrato 6.

Una vez que se complete el estudio conformacional de las glico-oligoamidas catiónicas, se realizaron estudios de interacción con polímeros de ADN ($\text{Poly}(\text{dA-dT})_2$ and $\text{Poly}(\text{dG-dC})_2$). Las titulaciones por $^1\text{H-NMR}$ revelaron que $\beta\text{-L-Man-Py-}\gamma[3(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ (**4**), era el ligando más eficiente a nivel cualitativo, para ambos tipos de secuencias, AT y GC. Desafortunadamente, debido al régimen de intercambio intermedio lento en el que se encuentran con el ADN, no fue posible emplear estos datos de RMN para cuantificar.

La interacción de estos ligandos, también fue investigada mediante ITC. Los estudios se realizaron en colaboración con Dr. Niklaas Buurma de la Universidad de

Cardiff. Se optimizó una metodología de valoraciones inversas para el caso particular de las glico-oligoamidas catiónicas, y se llevaron a cabo experimentos con todos los ligandos y polímeros de ADN, como FS-DNA y Poly(dA-dT)₂. Estos experimentos confirmaron la mejor afinidad del derivado de L-manosa (**4**) por el Poly(dA-dT)₂, y permitieron la caracterización termodinámica completa de dicha interacción. Sin embargo, debido a la más baja afinidad del derivado de D-manosa (**3**) por el ADN, no fue posible obtener un perfil termodinámico de la interacción de este diastereómero.

Para intentar entender las diferencias en afinidad de los dos compuestos, se realizaron estudios estructurales de los complejos con Poly(dA-dT)₂ and Poly(dG-dC)₂ por RMN (DF-STD, TR-NOESY). De nuevo, se encontraron estructuras conformacionales plegadas en forma de horquilla, similares a las obtenidas en el estado libre, con la cara α del carbohidrato hacia el indol. Los experimentos de DF-STD, mostraron diferencias en las orientaciones del carbohidrato dentro del surco menor del ADN en los distintos complejos. En los complejos con Poly(dA-dT)₂, para el derivado de D-manosa, el OH2 parece orientarse hacia el interior del surco menor. Para el caso del ligando de L-manosa, no fue posible definir una orientación particular de los centros del carbohidrato. Para los complejos con GC, vuelve a haber diferencias, en el caso del derivado de D-manosa (**3**) el OH2 queda hacia la región externa del surco, mientras que el mismo OH2 en el derivado de L-manosa (**4**) se orienta hacia el interior del surco del ADN, pudiendo participar en un proceso cooperativo de enlace de hidrógeno intermolecular. Además, en la colocación del grupo NH₃⁺ diferente en cada caso, puede tener una influencia en la afinidad de los compuestos.

Sorprendentemente, durante la realización de los experimentos de ITC, se encontró un posible proceso de agregación de las glico-oligoamidas catiónicas en agua. Se observó un proceso lento exotérmico, cuando se diluía la disolución de ligando en los experimentos de ITC. No obstante, al mismo tiempo, los experimentos de dilución monitorizados por ¹H- RMN, y realizados para descartar procesos de auto-asociación de los ligandos, no indicaron presencia de tal proceso. En ningún caso se observaron desplazamientos químicos inducidos (≤ 0.036 ppm) que pudieran ser indicativos de un proceso de agregación en disolución. Por este motivo, el último capítulo de la tesis se centra en el estudio del inesperado proceso de auto-asociación de las glico-oligoamidas en agua.

La mayoría de las moléculas orgánicas pequeñas diseñadas para unirse al ADN, poseen características estructurales que hacen que sean buenos ligandos del ADN, pero a la vez facilitan su agregación en disolución acuosa. No obstante, son raras las ocasiones en las cuales se comenta en la bibliografía. Para evaluar el proceso de agregación, en las condiciones de concentración correspondientes a los estudios de interacción, se realizaron experimentos de DLS. Además para caracterizar la morfología de los agregados se realizaron experimentos de AFM y SEM.

Efectivamente, se encontraron agregados de elevado peso molecular por DLS y se realizaron diferentes experimentos en distintas condiciones para intentar minimizar el proceso de agregación. Los experimentos de AFM y SEM permitieron concluir que la

morfología de los agregados es esférica, con una arquitectura de tipo vesicular hueca. A pesar de que se detectaron agregados grandes, al mismo tiempo, en DLS, también se detectaron señales correspondientes al monómero en disolución. Además, se realizaron experimentos de difusión por RMN (DOSY), que demostraron que todos nuestros datos de RMN permiten estudiar el monómero en disolución.

La principal conclusión de este estudio, es que en disolución hay un equilibrio dinámico entre el monómero y los agregados. Cada especie de este equilibrio puede ser estudiada dependiendo de la técnica que se empleó, lo que significa, que mientras el monómero en disolución es detectado mediante RMN, los agregados grandes se observan por DLS.

1. CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Relevancia del carbohidrato en procesos de reconocimiento molecular del ADN

La relevancia de los ácidos nucleicos y proteínas como biomoléculas capaces de albergar información fundamental para el desarrollo de procesos biológicos esenciales de cualquier organismo vivo es conocida desde hace tiempo. Sin embargo, para poder descifrar, comprender y explicar todos los eventos que suceden a nivel celular, existe un tercer elemento clave, los carbohidratos. En la última década, se ha puesto de manifiesto, como estas biomoléculas superan a los ácidos nucleicos y aminoácidos en cuanto a capacidad de almacenaje de información se refiere. Además son capaces de transferir dicha información actuando como ligandos en múltiples procesos biológicos de reconocimiento molecular.¹

El llamado dogma central de la biología molecular² asigna un papel decisivo tanto a ácidos nucleicos como proteínas en el flujo de la información en los biosistemas. La información codificada del ADN, se transcribe al ARN y se traduce en los ribosomas, que como consecuencia sintetizan proteínas. Este proceso implica las etapas clave de replicación, transcripción y traducción. No obstante, el concepto original del dogma central la biología molecular ignora las posibles modificaciones post-traduccionales que modulan las funciones de una proteína codificada por un gen en concreto. Las modificaciones post-traduccionales son modificaciones químicas que sufre una proteína después de su traducción.³ Estas modificaciones tienen una gran importancia ya que regulan actividad y función de proteínas, e interacción con otras biomoléculas, como lípidos, enzimas y ácidos nucleicos.⁴

Con el avance de la glicobiología se ha descubierto que una de las principales modificaciones post-traduccionales es la glicosilación de los residuos de serina o treonina con el carbohidrato *N*-Acetilglucosamina (GlcNAc). En concreto, en los últimos años, se ha confirmado que dicha modificación en proteínas nucleares tiene un papel fundamental en la regulación de la transcripción.⁵ De hecho, alrededor de un 25% de las proteínas modificadas por β -O-GlcNAc están involucradas en la regulación del proceso de transcripción y se han descrito numerosos ejemplos de factores de transcripción modificados por β -O-GlcNAc, que coordinan y regulan la expresión génica como por ejemplo PDX-1⁶ o CREB.⁷

¹ Solís, D.; Bovin, N. V.; Davis, A. P.; Jiménez-Barbero, J.; Romero, A.; Roy, R.; Smetana Jr, K.; Gabius, H.-J. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, 1850, 186-235.

² Crick, F. *Nature* **1970**, 227, 561-563.

³ (a) Perdew, G. H.; Heuvel, J. P.; Peters, J. M. *Regulation of Gene Expression* **2007**, 215-238. (b) Walsh, C. T.; Garneau-Tsodikova, S.; Gatto, G. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7342-7372.

⁴ (a) Seo, J.; Lee, K. J. *Biochem. Mol. Biol.* **2004**, 37, 35-44. (b) Nørregaard Jensen, O. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 33-41. (c) Porter, K.; Medford, H. M.; McIntosh, C. M.; Marsh, S. A. *Life Sci.* **2012**, 90, 89-98.

⁵ (a) Slawson, C.; Hart, G. W. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, 11, 678-684. (b) Özcan, S.; Andrali, S. S.; Cantrell, J. E. L. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, 1799, 353-364.

⁶ Akimoto, Y.; Hart, G. W.; Wells, L.; Vosseller, K.; Yamamoto, K.; Munetomo, E.; Ohara-Imaizumi, M.; Nishiwaki, C.; Nagamatsu, S.; Hirano, H.; Kawakami, H. *Glycobiology* **2007**, 17, 127-140.

⁷ Rexach, J. E.; Clark, P. M.; Mason, D. E.; Neve, R. L.; Peters, E. C.; Hsieh-Wilson, L. C. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 253-261.

La existencia del residuo GlcNAc en estas proteínas es crucial a la hora de modular la función de estos factores de transcripción y tiene un gran impacto en la transmisión de la información asociada al proceso. Como consecuencia la distinta actividad de estos factores de transcripción pueden existir implicaciones diferentes para un proceso biológico dado. De este modo, se pone de manifiesto la necesidad de comprender en detalle las bases moleculares del proceso de reconocimiento glico-proteína-ADN, y más en concreto de la unión carbohidrato-ADN. Para ello es necesario el desarrollo de aproximaciones que permitan mimetizar los complejos procesos de interacción glicoproteína-ADN que se producen durante la transcripción, al mismo tiempo que se logra simplificar el sistema con modelos, para poder estudiar las bases estructurales del reconocimiento molecular en detalle.

1.1.1 Estructura de la doble hélice de ADN y reconocimiento molecular

Como en cualquier proceso de interacción en sistemas biológicos, el reconocimiento específico de las secuencias de ADN por moléculas pequeñas depende de la complementariedad de sus superficies moleculares.⁸ Por lo tanto, es importante analizar primero las principales características estructurales de la forma B de la doble hélice de ADN, que es una de las conformaciones más prevalentes a pH fisiológico. Está formada por dos cadenas antiparalelas de desoxiribonucleótidos que se complementan y giran una sobre la otra, dando lugar a una estructura doble hélice con giro hacia la derecha. La estructura se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre los pares de bases complementarios de Watson y Crick (Adenina, Timina, Guanina y Citosina), a la vez que las superficies apolares de las bases se sitúan en el centro de la hélice gracias a interacciones hidrofóbicas, quedando los grupos fosfatos hidrofílicos hacia el exterior de la doble hélice (Figura 1.1).

⁸ Rohs, R.; West, S. M.; Sosinsky, A.; Liu, P.; Mann, R. S.; Honig, B. *Nature* **2009**, 461, 1248-1253.

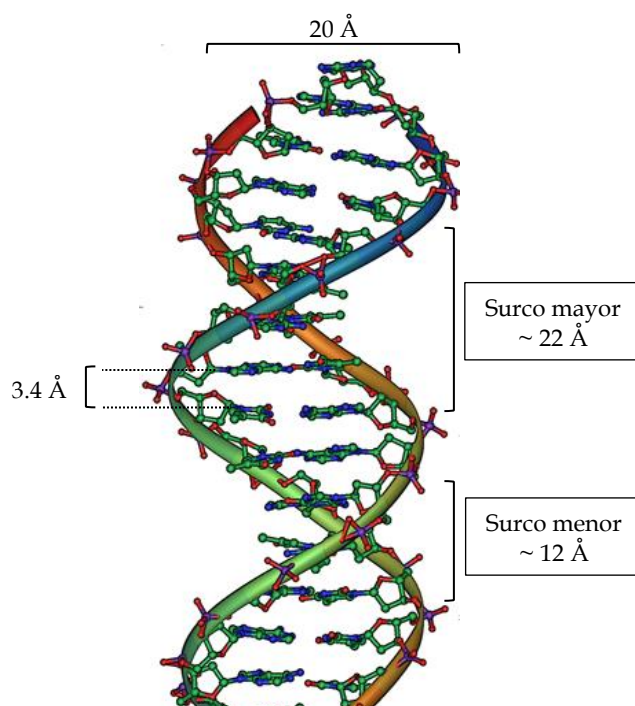


Figura 1.1 Representación de una conformación B-ADN, con las principales dimensiones estructurales detalladas.

La asimetría de los nucleótidos genera dos surcos con diferentes geometrías: el surco mayor y el surco menor. El surco mayor es ancho y con poca profundidad, y el surco menor es más estrecho pero más profundo. Además, el surco menor suele tener un potencial electronegativo mayor que el surco mayor, especialmente en secuencias ricas en pares de bases AT. Tanto a nivel estructural como a nivel dinámico, la conformación B del ADN depende mucho de la secuencia de pares de bases que la componga. La secuencia de las bases a lo largo de la cadena polimérica, no solo codifica la información genética, sino que también es un código estructural que influencia la topología local del ADN.⁹ Por ejemplo, como consecuencia del distinto patrón de enlace de hidrógeno de cada par de bases, y las distintas interacciones π - π stacking entre nucleótidos adyacentes, las secuencias ricas en pares de bases AT tienen un mayor estrechamiento del surco menor del ADN, mientras que en los segmentos con mayor abundancia de secuencias GC el surco menor es más amplio.¹⁰ Además, las distintas bases nitrogenadas, poseen átomos potencialmente dadores o aceptores de enlace de hidrógeno que se distribuyen a lo largo de los surcos de la doble hélice. De esta forma se genera un patrón de motivos de enlaces de hidrógeno característico para cada par de bases complementario (Figura 1.2). Hay un patrón más variable de dadores y aceptores de enlace de hidrógeno en los extremos de las bases orientadas hacia el surco mayor. Desde el punto de vista del reconocimiento molecular de este surco, esto puede suponer una ventaja a la hora de discriminar entre los diferentes pares de bases. En cuanto al surco menor, la principal diferencia entre los pares de bases, es que el par

⁹ (a) Calladine, C. R. *J. Mol. Biol.* **1982**, 161, 343-352. (b) Sarai, A.; Mazur, J.; Nussinov, R.; Jernigan, R. L. *Biochemistry* **1988**, 27, 8498-8502.

¹⁰ (a) R. Stefl, H. Wu, S. Ravindranathan, V. Sklenar, J. Feigon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 177-1182. (b) A. S. Maki, T. Kim, E. T. Kool, *Biochemistry* **2004**, 43, 1102-1110. (c) D. M. Crothers, T. E. Haran, J. G. Nadeau, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 7093 - 7096.

GC contiene un grupo amino exocíclico que penetra en el surco menor. Este grupo amino hace que, tanto a nivel estérico como electrónico, el surco menor de secuencias GC sea diferente del de secuencias AT.

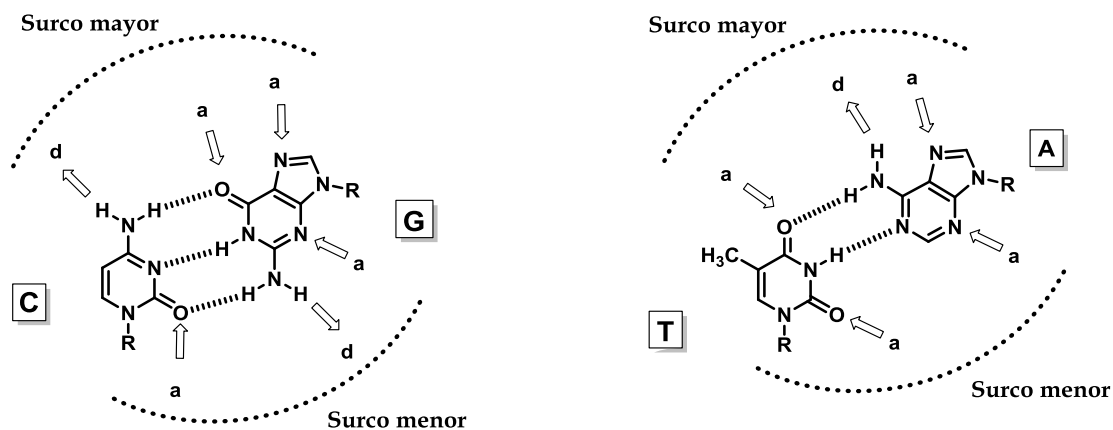


Figura 1.2 Pares de bases complementarias del ADN, con el patrón de aceptores (a) y dadores (d) de enlace de hidrógeno que se sitúan en cada surco.

El reconocimiento supramolecular del B-ADN puede tener lugar de cuatro maneras diferentes: unión externa con los grupos fosfatos, reconocimiento mediante intercalación del ligando entre los pares de bases y reconocimiento a través de los surco mayor y menor (Figura 1.3).

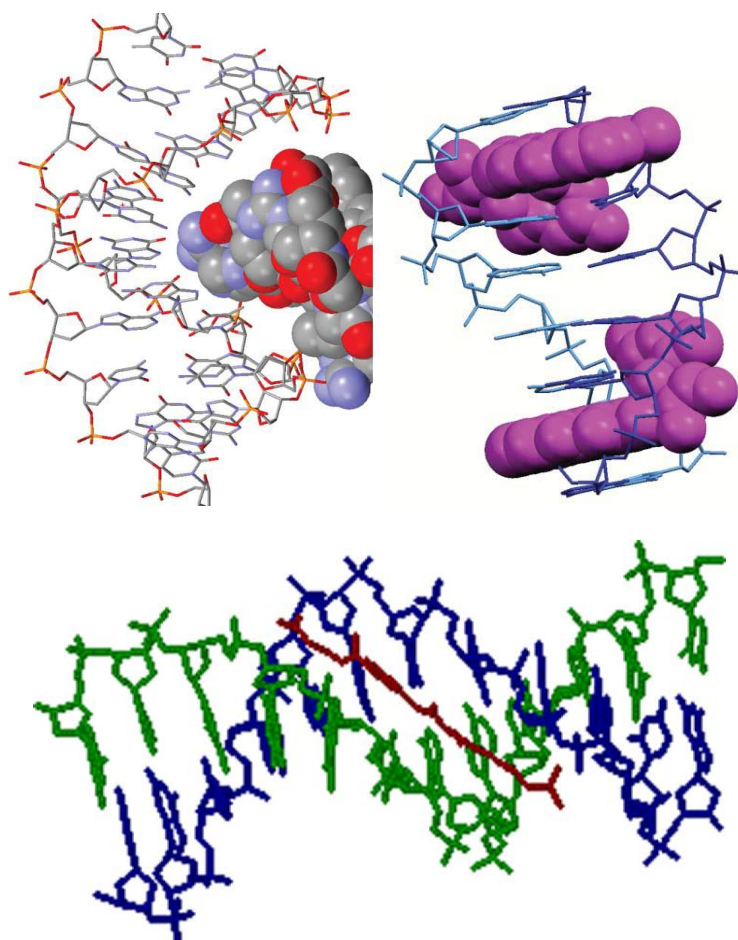


Figura 1.3 Estructuras representativas de los diferentes tipos de unión al ADN. A) Complejo de una unidad polipeptídica de un dedo de zinc con el surco mayor del ADN (PDB ID: 1A1J). B) Estructura de un complejo de un oligonucleótido con dos unidades de doxorubicina intercaladas entre las bases (PDB ID: 1D12) C) Estructura cristalina de un complejo de netropsina dentro del surco menor de un oligonucleótido (PDB ID: 121D).

El ADN es una biomolécula con una elevada densidad de carga negativa que le confieren los grupos fosfato, y que se estabiliza con cationes Na^+ o Mg^{2+} . Como consecuencia, las moléculas orgánicas catiónicas se pueden unir de manera externa a los grupos fosfatos mediante interacciones electrostáticas, liberando los contraiones. Estas interacciones dependen de fuerza iónica del medio y son generalmente débiles para moléculas monocatiónicas en medio fisiológico. En general, la afinidad de este tipo de ligandos aumenta con concentraciones bajas de sales en disolución.¹¹

Uno de los modos de unión al ADN más comunes, es la intercalación. Este concepto fue propuesto por Lerner en 1961 dentro de sus estudios de interacción de acridonas con ADN.¹² Este modo de unión suele ser característico de moléculas aromáticas planas, que se introducen en el hueco hidrofóbico existente entre los pares de bases, estableciendo interacciones π - π con los pares de bases situados por encima y por debajo (Figura 1.3 B). La unión mediante intercalación suele causar distorsiones

¹¹ Strekowski, L.; Wilson, B. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2007**, 623, 3-13.

¹² Lerner, L.S. *J. Mol. Biol.*; **1961**, 3,18-30.

geométricas en la estructura del ADN, y suele ser un proceso favorecido entálpicamente.

Por último, el reconocimiento molecular del ADN a través de los surcos, puede implicar al surco mayor o al menor. La mayoría de las proteínas que interaccionan con el ADN, lo hacen con especificidad de secuencia a través del surco mayor.¹³ El tamaño de este surco, permite la interacción de una estructura secundaria de la proteína que actúe como dominio de unión, mientras que el surco menor es demasiado estrecho y solo permite la inserción de cadenas peptídicas lineales. Además, la variedad del patrón de dadores y aceptores de enlace de hidrógeno que tiene el surco mayor hacen de él una diana biológica atractiva. Muestra de ello son los diversos ejemplos de productos naturales que se asocian al surco mayor con selectividad de secuencia.¹⁴ No obstante, en general, las moléculas de pequeño tamaño, que no son intercalantes, suelen asociarse al surco menor. La mayor parte de estos ligandos comparten unas características estructurales comunes, que conllevan la selectividad en la unión con la doble hélice de ADN. En primer lugar, las moléculas necesitan una curvatura que se adapte a la curvatura del surco menor del B-ADN. Además, las paredes del surco menor son hidrofóbicas, por lo que sus ligandos suelen tener en su estructura una región hidrofóbica. Otra característica común es que casi todos los ligandos del surco, tienen alguna carga positiva, por lo que las interacciones electrostáticas con los grupos fosfatos se consideran importantes en la unión. Por último, la mayoría de estos ligandos establecen enlaces de hidrógeno con los extremos de las bases nitrogenadas que se orientan al surco menor. La cooperatividad de estas interacciones hace que se formen complejos estables entre estos ligandos y el surco menor.

1.1.2 Carbohidratos y reconocimiento molecular

Los carbohidratos constituyen uno de los tipos de biomoléculas más abundante y más complejo de la naturaleza. Además de existir en forma de oligosacáridos y polisacáridos, en muchas ocasiones forman parte de otros tipos de biomoléculas, son parte fundamental de los ácidos nucleicos y están presentes en multitud de proteínas. Sus propiedades y funciones cubren un amplio rango, desde almacenamiento de energía y función meramente estructural en plantas e insectos, hasta desempeñar un papel fundamental en procesos celulares cruciales, como reconocimiento celular, crecimiento, apoptosis y respuesta inmune.¹⁵

A nivel molecular, cada monosacárido puede ser sustituido y presentar hasta 16 isómeros diferentes. Además, el anillo de piranosa confiere a los monosacáridos un carácter tridimensional, donde se pueden definir seis caras. Dos de ellas, las caras α y β , están definidas por el plano que contiene a los átomos de carbono del anillo (Figura 1.4). También quedan definidos dos lados del carbohidrato diferentes, uno constituido

¹³ Rohs, R.; Jin, X.; West, S. M.; Joshi, R.; Honig, B.; Mann, R. S. *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, 79, 233-269.

¹⁴ Hamilton, P. L.; Arya, D.P. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 134-143.

¹⁵ (a) Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683-720. (b) Gabius, H. J.; Siebert, H. C.; Andre, S.; Jimenez-Barbero, J.; Rudiger, H. *Chembiochem.* **2004**, 5, 740-64. (b) Gabius, H. J.; Andre, S.; Jimenez-Barbero, J.; Romero, A.; Solís, D. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, 36, 298-313.

por el oxígeno de la piranosa y por el carbono de la posición 5, y el lado opuesto, definido por los centros C2 y C3.

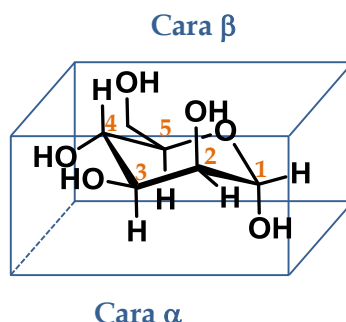


Figura 1.4 Representación de las seis caras que presenta un monosacárido. En la figura se muestra como ejemplo la D- α -manopiranososa.

Cuando se incorpora a estructuras más complejas, un solo monosacárido puede combinarse de múltiples maneras, por lo que las posibilidades adicionales de ramificación de los polisacáridos, puede dar lugar una gran variedad estructural y composicional. Debido a esta complejidad estructural son moléculas con un elevado potencial para codificar información biológica.

El desarrollo de diferentes técnicas biofísicas y técnicas espectroscópicas, como los rayos X y la resonancia magnética nuclear (RMN), complementadas por parámetros termodinámicos obtenidos mediante microcalorimetría, han permitido la obtención de información a nivel atómico del reconocimiento molecular llevado a cabo por carbohidratos, principalmente con proteínas. Esto ha permitido especular sobre la distinta implicación de diferentes fuerzas supramoleculares involucradas en los procesos de interacción de carbohidratos. Dada la presencia de los numerosos grupos hidroxilos en los carbohidratos, no sorprende que una de las principales interacciones implicadas sean los enlaces de hidrógeno, como así revelan distintos estudios cristalográficos.¹⁶ Adicionalmente, a pesar de la naturaleza hidrofílica de la mayoría de los azúcares, multitud de estudios de RMN y estructuras d rayos X, muestran como los anillos aromáticos suelen estar presentes en el centro de reconocimiento de las proteínas y juegan un papel importante en el proceso de interacción.¹⁷ Esto pone de manifiesto la participación adicional de interacciones de tipo van der Waals, donde la cara más hidrofóbica del carbohidrato interacciona con un residuo aromático (interacciones CH- π). La coexistencia y participación de ambos tipos de interacción, enlaces de hidrogeno y carbohidratos, fue propuesta inicialmente por Quijoch y Leunieux¹⁸ después de numerosos estudios de complejos entre carbohidratos y lectinas.

¹⁶ Vyas, N. K. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, 1, 732-740.

¹⁷ (a) Glickson, J. D.; Phillips, W. D.; Rupley, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 4031-4035. (b) Quijoch, F. A. *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, 55, 287-315.

¹⁸ (a) Lemieux, R.U. *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 373-380. (b) Quijoch, F.A. *Pure Appl. Chem*, **1989**, 61, 1293-1306.

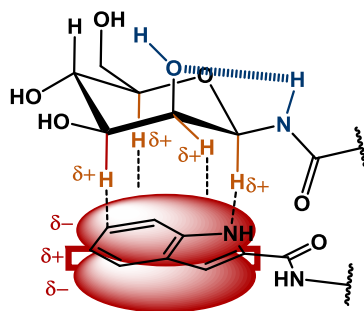


Figura 1.5 Representación esquemática de las principales fuerzas que gobiernan los procesos de reconocimiento e interacción de carbohidratos, enlaces de hidrógeno e interacciones CH- π .

Como se ha comentado, los carbohidratos poseen propiedades excepcionales para codificar información. Para lograr convertir esa información en una función determinada, estas moléculas ofrecen una gran versatilidad a la hora de establecer interacciones intermoleculares. A nivel topológico, la distinta disposición de los hidroxilos genera un diferente reconocimiento del entorno mediante los posibles enlaces de hidrógeno que se pueden formar. Esto, sumado a la capacidad de reconocer residuos aromáticos de los distintos aminoácidos (Trp, Tyr, Phe), genera un código de reconocimiento muy complejo. El conocimiento en profundidad de las fuerzas que regulan este código, principalmente interacciones CH- π y enlaces de hidrógeno, y si existe una inter-relación o cooperación entre ambas fuerza, ayudaría a descifrar el código de los azúcares.

1.1.2.1 Interacciones CH- π

Las interacciones CH- π son fuerzas atractivas entre fragmentos CH polarizados y el sistema π de un anillo aromático, cuya relevancia en procesos de reconocimiento de carbohidratos se puso de manifiesto a principios de la década de los 90. Esta fuerza atractiva tiene carácter dual, es efectiva tanto en disolventes polares como en disolventes apolares. La direccionalidad es un requisito para distinguir estas interacciones de meras fuerzas de dispersión de London. Cuanto más lineal sea la interacción más fuerte será.¹⁹ La fortaleza de estas interacciones es débil, una sola interacción CH- π puede ser 1 kcal/mol.²⁰ Sin embargo, otra característica interesante es que son interacciones cooperativas, por lo que la interacción simultánea de varios CH con un sistema aromático aumenta la fortaleza de la interacción.²¹ De esta forma, en los carbohidratos, cuando hay tres grupos CH con una disposición axial en una de las caras del azúcar, o tres CH que forman un plano, este puede interaccionar de manera efectiva con la superficie de un residuo aromático. Los detalles de la naturaleza de estas interacciones siguen siendo objeto de investigación, no obstante, se piensa que

¹⁹ Nishio, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 13873-13900.

²⁰ (a) Jiménez-Barbero, J.; Javier Cañada, F.; Asensio, J. L.; Aboitiz, N.; Vidal, P.; Canales, A.; Groves, P.; Gabius, H.-J.; Siebert, H.-C. In *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*; Derek, H., Ed.; Academic Press: 2006; Vol. Volume 60, p 303. (b) Asensio, J. L.; Ardá, A.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J. *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 946-954.

²¹ (a) Fernández-Alonso, M. d. C.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Cuevas, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7379-7386. (b) Vandenbussche, S.; Díaz, D.; Fernández-Alonso, M. C.; Pan, W.; Vincent, S. P.; Cuevas, G.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Bartik, K. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 7570-7578.

esta fuerza atractiva tiene tanto una contribución entrópica debida a la aproximación de las dos superficies apolares evitando el agua, como una contribución entálpica debido al enlace de hidrógeno no convencional que se establece entre el hidrógeno con carga parcial positiva del enlace CH y el cuadrupolo creado por el sistema π del anillo aromático. A pesar de los múltiples estudios publicados en los últimos años ²² todavía no se ha logrado obtener una descripción detallada y cuantificada del origen y la relación de estructura-actividad que gobiernan en este tipo de interacciones en agua.

1.1.2.2 Enlaces de hidrógeno y cooperatividad

Un enlace de hidrógeno es una interacción atractiva entre dos especies, cuyo origen está en la unión del tipo A-H...B, donde A y B tienen una electronegatividad elevada, mientras que B posee un par de electrones no compartido. De esta forma se genera un dipolo donde en el átomo de hidrógeno se forma una carga parcial positiva y en el otro átomo una carga parcial negativa. El grupo AH es conocido generalmente como dador de enlace de hidrógeno y el átomo B se nombra como aceptor de enlace de hidrógeno. La fortaleza del enlace de hidrógeno aumenta con el incremento del momento dipolar entre el enlace AH y el par de electrones no compartido del átomo B. La gran dependencia de la naturaleza del enlace de hidrógeno con la distribución electrónica proporciona una manera eficaz de modular la fortaleza de la interacción.

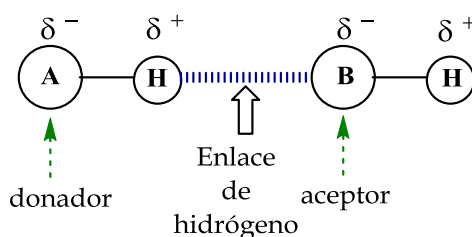


Figura 1.6 Representación esquemática de la distribución de cargas parciales en un enlace de hidrógeno

Actualmente, se sabe que la interacción de enlace de hidrógeno es una complicada conjunción de cinco contribuciones energéticas individuales de magnitud similar: 1) energía electrostática o coulombica, repulsión de intercambio, energía de polarización, energía de transferencia de carga y fuerzas de dispersión.²³

El elevado número de hidroxilos presentes en un carbohidrato y su proximidad propicia la formación de enlaces de hidrogeno OH...OH tanto intramoleculares como intermoleculares. Este tipo de interacciones ayudan a estabilizar conformaciones específicas en oligosacáridos y también son fundamentales en los procesos de reconocimiento molecular de carbohidratos. Una particularidad de los hidroxilos es que son capaces de actuar tanto como donadores de enlace de hidrógeno como

²² (a) Nishio, M.; Umezawa, Y.; Fantini, J.; Weiss, M. S.; Chakrabarti, P. *PCCP* **2014**, *16*, 12648-12683. (b) Jiménez-Moreno, E.; Jimenez-Oses, G.; Gomez, A. M.; Santana, A. G.; Corzana, F.; Bastida, A.; Jimenez-Barbero, J.; Asensio, J. L. *Chem. Sci.* **2015**. (c) Jiménez-Moreno, E.; Gómez, A. M.; Bastida, A.; Corzana, F.; Jiménez-Oses, G.; Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4344.

²³ Prins, L. J.; Reinhoudt, D. N.; Timmerman, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2382-2426.

aceptores, debido al par de electrones sin compartir del oxígeno. Esta característica da lugar a la existencia del fenómeno que se conoce como cooperatividad de enlace de hidrógeno.

La cooperatividad de enlace de hidrógeno fue definida por Frank y Wen como como el fortalecimiento de un primer enlace de hidrógeno entre un dador y un aceptor, $D-H\cdots A-H$, cuando un segundo enlace de hidrógeno se forma entre una de estas dos especies y un tercer centro B (Figura 1.7).²⁴

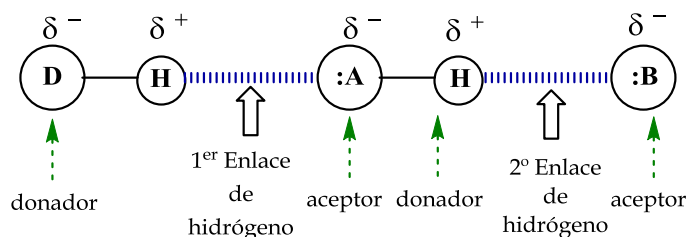


Figura 1.7 Esquema representativo de una red cooperativa de enlace de hidrógeno

El origen de este fenómeno se basa en que la fuerza de un enlace de hidrógeno es directamente proporcional al carácter iónico parcial de las especies donadora y aceptora involucradas en el enlace. La presencia del enlace de hidrógeno provoca un incremento de la carga parcial negativa del centro donador, y un aumento en la carga parcial positiva en el centro aceptor. En consecuencia, aumenta la capacidad donadora de A y la capacidad aceptora de D, favoreciendo el establecimiento de un segundo enlace de hidrógeno. Para que se establezca el segundo enlace de hidrógeno, la especie AH, debe ser al mismo tiempo, donador y aceptor.

Los carbohidratos contienen un número de grupos OH en extensión y a una distancia adecuada como para formar cadenas y ciclos de enlaces de hidrógeno cooperativos. Sin embargo, la complejidad estructural de estas moléculas hace difícil el estudio de la cooperatividad en disolución. De hecho, la mayoría de las evidencias experimentales acerca de la cooperatividad de enlace de hidrógeno en carbohidratos provienen de estudios en estado sólido.²⁵ Por el contrario los estudios de cooperatividad de enlace de hidrógeno de tipo $O-H\cdots O$ intramoleculares en carbohidratos llevados a cabo en disolución son escasos.²⁶ A pesar de la evidente implicación de la cooperatividad de EH en la estructura y reconocimiento molecular de los carbohidratos, no se han publicado estudios sistemáticos que permitan cuantificar este fenómeno en procesos intermoleculares en agua.

²⁴ Frank, H. S.; Wen, W-Y. *Discuss. Faraday Soc.* **1957**, 24, 133-140.

²⁵ (a) Jeffrey, G. A.; Kim, H. S. *Carbohydr. Res.* **1978**, 14, 207-216. (b) Notelmeyer, M.; Saenger, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 2710-2722. (c) Steiner, T.; Saenger, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7123-7126.

²⁶ Christofides, J. C.; Davies, D. B.; Martin, J. A.; Rathbone, E. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 5738-5743. (b) Christofides, J. C.; Davies, D. B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1987**, 97-102.

1.1.3 Relevancia del reconocimiento carbohidrato-ADN

Un aspecto muy importante del reconocimiento llevado a cabo por carbohidratos pero a la vez mucho menos estudiado, es la interacción entre unidades sacarídicas y el ADN. De hecho, el conocimiento de fármacos que se unen al ADN y que contienen carbohidratos en su estructura, se remonta a hace varias décadas. Sin embargo, el papel del residuo sacarídico en estas moléculas ha sido desconocido durante años. Los primeros estudios en los que se reveló la importancia del carbohidrato fueron llevados a cabo con antibióticos de la familia de las antraciclinas, que además tienen actividad antitumoral (Figura 1.8). En ellos se demostró que el número y el patrón de sustitución de la cadena de carbohidrato, tiene un profundo efecto en la actividad biológica de estas moléculas y que la eliminación del fragmento sacarídico iba acompañado por la pérdida de actividad de los compuestos.²⁷ Al mismo tiempo, gracias a experimentos de RMN y Rayos-X, se obtuvieron evidencias estructurales en complejos de ADN con antraciclinas, que apuntaban a la posible interacción del fragmento del carbohidrato con el surco menor del ADN mediante fuerzas de van der Waals, mientras el residuo aromático se intercalaba entre las bases.²⁸ Otro ejemplo de familia de compuestos antitumorales con carbohidratos en su estructura son las bleomicinas, glicopéptidos que fragmentan la cadena de ADN (Figura 1.8). En este caso, el carbohidrato es un disacárido compuesto por una unidad de D-manosa y otra de L-gulosa. La falta del residuo sacarídico no afecta al proceso de ruptura de la cadena del ADN, sin embargo la afinidad de compuesto por el ADN se ve profundamente afectada, reduciéndose hasta 35 veces.²⁹ También existen ejemplos de glicoconjugados, donde la eliminación del residuo sacarídico va acompañada de una pérdida de actividad. Tal es el caso de los indolocarbazoles glicosustituídos, como la rebecamicina, los cuales interfieren en la acción de la topoisomerasa I y presentan una actividad antitumoral de amplio espectro. Se ha demostrado que los análogos de rebecamicina son mucho más activos que los correspondientes aglicones carentes del residuo sacarídico.³⁰ Es decir, el azúcar es un elemento clave, tanto para la unión al ADN como para la inhibición de la topoisomerasa I.

²⁷ (a) *Anthracycline and Anthracenedione-based Anticancer Agents*, Bioactive Molecules, ed J. W. Lown, Vol III Elsevier, Amsterdam, 1988 (b) Lown, J.W. *Chem. Soc. Rev.* **1993**, 22, 165-176.

²⁸ Quigley, G.J.; Wang A. H.-J.; Ughetto, G.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, 77, 7204-7208. (c) Frederick, C. A.; Williams, L. D.; Ughetto, G.; Van der Marel, G. A.; Van Boom, J. H.; Rich, A.; Wang, A. H. J. *Biochemistry* **1990**, 29, 2538-2549.

²⁹ Boger, D.L.; Teramoto, S.; Zhou, J. J. *Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7344-7356.

³⁰ Bailly, C.; Qu, X.; Anizon, F.; Prudhomme, M.; Riou, J.-F.; Chaires, J. B. *Mol. Pharmacol.* **1999**, 55, 377-385.

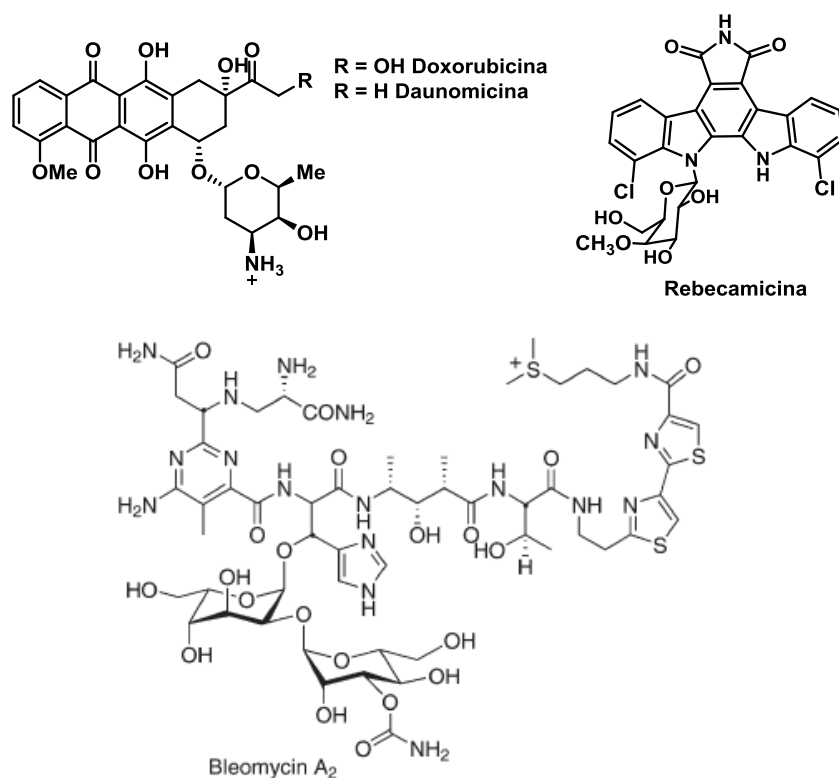


Figura 1.8 Estructuras de distintos glico-conjugados con actividad antitumoral.

No obstante, quizás el ejemplo que mejor representa la importancia del carbohidrato en el reconocimiento molecular del ADN y el papel del azúcar en la selectividad de secuencia, es la calicheamicina γ_1^I . La calicheamicina γ_1^I es un miembro de la familia de antibióticos endiánicos con actividad antitumoral, cuya estructura está constituida por una unidad bicíclica de endiño unida a una cola de un ariltetrasacárido (Figura 1.9).

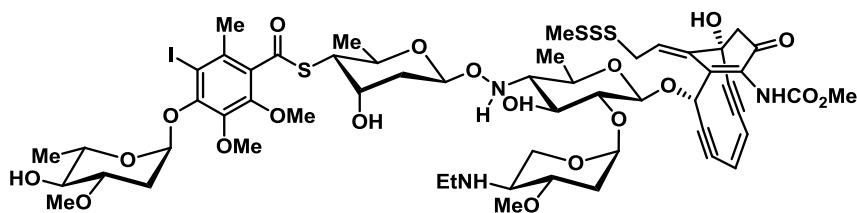


Figura 1.9 Estructura de la Calicheamicina γ_1^I .

Este potente antitumoral, interacciona con el surco menor del ADN y provoca la ruptura de la doble hélice en secuencias específicas. El mecanismo implica un reordenamiento del endiño bajo condiciones reductoras, que genera un diradical 1,4-arílico, el cual sustrae átomos de hidrógeno del esqueleto de ADN, iniciando la escisión de las hebras.³¹ Estudios sobre la selectividad de secuencia en la ruptura del ADN por parte de la calicheamicina, mostraron un nuevo tipo de selectividad, diferente a la selectividad por pares de bases AT o GC encontradas hasta el momento. El ligando

³¹ (a) Nicolaou, K. C.; Dai, W. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, 30, 1387-1416. (b) Wolkenberg, S. E.; Boger, D. L. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 2477-2496.

tenía preferencia por unirse a secuencias que contuvieran tres o más pirimidinas seguidas.³² El mecanismo mediante el cual se producía esta inusual especificidad de secuencia, debía ser capaz de explicar la afinidad de la calicheamicina por sitios de unión con distintas funcionalidades, puesto que algunas pirimidinas contenían un grupo amino y otras no. Estudios realizados con derivados de la calicheamicina carentes de dos o más unidades sacarídicas, demostraron que el oligosacárido era el responsable de la selectividad por las oligopirimidinas. Kahne y colaboradores propusieron que la selectividad en la unión llevaba asociado un proceso de ajuste inducido, basándose en el análisis de los diferentes sitios de unión formados por las pirimidinas.³³ Numerosos estudios llevados a cabo mediante dicroísmo circular y RMN apoyaron esta teoría, y mostraron como el oligosacárido de la calicheamicina se situaba perfectamente en la curvatura del surco menor del ADN, entrando en contacto con las bases pirimidínicas.³⁴ Curiosamente, la posición del oligosacárido en complejos con secuencias de tipo ACCT, TTTT y TCCT, es esencialmente idéntica al margen de la composición de la secuencia reconocida.³⁵ Esta similitud en la disposición del oligosacárido en los diferentes complejos, evidencia algún tipo de característica estructural común en las secuencias de oligopirimidinas que la calicheamicina es capaz de distinguir. Sin embargo, el patrón de enlace de hidrógeno mostrado por las diferentes secuencias pirimidínicas no guarda analogía entre sí. Al contrario que otros oligosacáridos, los carbohidratos que constituyen la calicheamicina son inusualmente hidrofóbicos y contienen un número pequeño de dadores/aceptores de enlace de hidrógeno. Los estudios de Kahn apuntan a que la mayor parte de los centros del carbohidrato que pueden participar en enlaces de hidrógeno, se orientan hacia la zona del surco donde se sitúan las desoxirribosas y los grupos fosfato, en lugar de orientarse hacia las bases.³⁶ En estos estudios también se observaron cambios estructurales en la doble hélice inducidos por la unión del ligando, como el ensanchamiento del surco menor y cambios en la conformación de alguna desoxirribosa. Esto puede indicar, que las secuencias de pirimidinas son más proclives a distorsionarse para acomodar al ligando en el surco menor, pudiendo ser las diferencias energéticas el origen de la selectividad de secuencia. En esta ocasión las interacciones electrostáticas, comunes en otro tipo de complejos al ADN, no parecen tener un papel relevante en la unión, mientras que las interacciones hidrofóbicas son un factor importante en la asociación de la calicheamicina y el ADN.³⁷ Otro factor relevante en el reconocimiento de las secuencias pirimidínicas, parece ser la rigidez conformacional de la estructura del ariltetrasacárido que le confieren las piranosas, y la restricción conformacional de los

³² Walker, S.; Landovitz, R.; Ding, W. D.; Ellestad, G. A.; Kahne, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4608-4612.

³³ Kahne, D. *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 7-12.

³⁴ Estudios de CD: (a) Uesugi, M.; Sugiura, Y. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4622-4627. Estudios de RMN (b) Paloma, L. G.; Smith, J. A.; Chazin, W. J.; Nicolaou, K. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3697-3708.

³⁵ Kalben, A.; Pal, S.; Andreotti, A.M.; Walker, S.; Gange, D.; Biswas, K.; Kahne, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8403-8420.

³⁶ (a) Walker, S.; Murnick, J.; Kahne, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7954-7961. (b) Walker, S.; Andreotti, A.H.; Kahne, D. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1351-1360.

³⁷ (a) Ding, W.-D.; Ellestad, G.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6617-6620. (b) Krishnamurthy, G.; Brenowitz, M. D.; Ellestad, G. A. *Biochemistry* **1995**, *34*, 1001-1010.

enlaces glicosídicos. Probablemente, la calicheamicina emplea esta rigidez y su conformación extendida para buscar la secuencia más flexible del ADN y unirse a ella mediante un mecanismo de ajuste inducido.

Existen otros ejemplos de ligandos del ADN que contienen carbohidratos en su estructura, que pueden ser comparados con la calicheamicina, por su carácter hidrofóbico. Este es el caso de los derivados del ácido aureólico, como la cromomicina A₃, donde varios de los carbohidratos de su estructura son 2,6-didesoxisazúcares y algunos de los hidroxilos están metilados o acetilados (Figura 1.10).

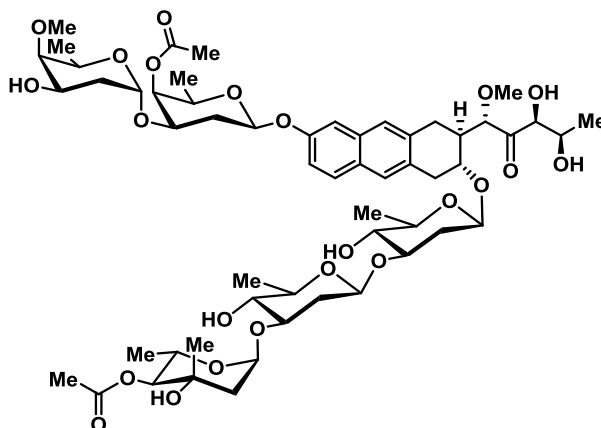


Figura 1.10 Estructura de la cromomicina A₃, miembro de la familia de ácidos aureólicos.

En estos compuestos, el fragmento sacarídico también es esencial para la unión al ADN.³⁸ Al igual que en el caso de la calicheamicina, se piensa que, tanto la hidrofobia de los carbohidratos, como su rigidez conformacional resultan importantes a la hora de forzar al ADN a adaptarse a la forma del ligando en el momento de la formación del complejo.³⁹

A pesar de la cantidad de estudios realizados, orientados a descubrir el origen de la selectividad de estos glicoconjugados por determinadas secuencias del ADN y la implicación del carbohidrato, las bases moleculares que rigen su función en el proceso de reconocimiento de secuencia siguen siendo desconocidas. Por lo tanto, el diseño de nuevos ligandos del ADN que contengan carbohidratos en su estructura, como estrategia para lograr selectividad de secuencia aprovechando las zonas del ADN más flexibles, no está muy extendido. De momento, esta estrategia de ajuste inducido, centrada en explotar la habilidad del oligosacárido para detectar la secuencia más flexible del ADN para acomodar al ligando, solo ha podido ponerse en práctica con oligosacáridos derivados del fragmento sacarídico de la calicheamicina. Nicolaou y colaboradores, sintetizaron distintos dímeros del fragmento oligosacarídico de la calicheamicina, que lograron inhibir la actividad de la propia calicheamicina, mostrando afinidades muy superiores ($K_d = 10^{-9}$ M) a las del monómero ($K_d = 10^{-6}$

³⁸ Silva, D.J.; Kahne, D. J. *Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7962-7970.

³⁹ (a) Gao, X.; Mirau, P.; Patel, D. J. *J.Mol. Biol.* **1992**, 223, 259-279. (b) Katahira, R.; Yamashita, Y.; Ogawa, H.; Yoshida, M.; Katahira, M.; Kyogoku, Y. *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 744-755.

M).⁴⁰ Aunque esta aproximación ha aportado información relevante sobre la interacción carbohidrato-ADN, existe la limitación derivada de la necesidad de mantener la estructura general del oligosacárido. Con este método, no es posible un cambio drástico en la estructura del carbohidrato para explorar nuevos motivos de unión sin perder completamente la interacción con el ADN.

Se han descrito numerosos ejemplos de ligandos del B-ADN que contienen en su estructura un dominio sacarídico, sin embargo, son pocos los ejemplos de ligandos de la doble hélice que estén compuestos exclusivamente por carbohidratos. Estos ejemplos se limitan a los antibióticos derivados de aminoglicósidos como la neomicina. La naturaleza no aromática de estos compuestos limita su unión a zonas del ADN como los surcos o los grupos fosfatos. Arya y colaboradores, han demostrado que este tipo de derivados son capaces de unirse tanto a diversas conformaciones de ARN, como a distintas formas del ADN, desde el surco mayor de B-ADN⁴¹ hasta triples hélices⁴² y cuádruplex.⁴³ No obstante, este tipo de estudios se limita a oligosacáridos formados por al menos cuatro unidades monosacáridicas con múltiples grupos amino protonados, ya que un monosacárido aislado no presenta afinidad por el ADN.

Por lo tanto, el estudio de las interacciones carbohidrato-ADN presenta, en primer lugar, la dificultad de diseñar una estrategia eficaz para lograr acercar carbohidratos sencillos al surco menor del ADN. De esta manera, se podría explorar la interacción de distintas estructuras sacarídicas con distintos tipos de secuencias, para poder establecer unas pautas estructurales en el reconocimiento carbohidrato-ADN. Esto facilitaría el entendimiento de dicha interacción y ayudaría al desarrollo de moléculas con carbohidratos, capaces de leer específicamente secuencias de ADN y establecer reglas moleculares para el diseño de elementos de reconocimiento de secuencias de una manera sistemática.

1.2 Antecedentes

El proyecto general de investigación en el cual se enmarca esta tesis, está destinado a comprender y establecer las bases moleculares del reconocimiento molecular de carbohidratos y el surco menor del ADN.

En trabajos iniciales del grupo de investigación, se había aplicado el concepto de cooperatividad de enlace de hidrógeno, para lograr dimerizaciones eficaces de carbohidratos⁴⁴ y complejos estables con piridina en disolventes orgánicos.⁴⁵ Haciendo

⁴⁰ (a) Bifulco, G.; Galeone, A.; Gomez-Paloma, L.; Nicolaou, K. C.; Chazin, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8817-8824. (b) Bifulco, G.; Galeone, A.; Nicolaou, K. C.; Chazin, W. J.; Gomez-Paloma, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7183-7191.

⁴¹ Kumar, S.; Xue, L.; Arya, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7361-7375.

⁴² (a) Arya, D. P.; Coffee, R. L., Jr.; Willis, B.; Abramovitch, A. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5385-5395. (b) Arya, D. P.; Coffee, R. L., Jr.; Charles, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11093-11094. (c) Xi, H.; Arya, D. P. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2005**, *5*, 327-338.

⁴³ Ranjan, N.; Andreasen, K. F.; Kumar, S.; Hyde-Volpe, D.; Arya, D. P. *Biochemistry* **2010**, *49*, 9891-9903.

⁴⁴ (a) Lopez de la Paz, M.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Commun.* **1998**, 465-466. (b) Luque, F. J.; López, J. M.; López de la Paz, M.; Vicent, C.; Orozco, M. *The Journal of Physical Chemistry A* **1998**, *102*, 6690-6696.

uso de esta experiencia previa, la primera aproximación que se planteó para el estudio de la interacción carbohidrato-ADN, fue explorar el uso de la cooperatividad de enlace de hidrógeno en carbohidratos en disolventes orgánicos, como herramienta para favorecer su interacción con los pares de bases del ADN. Los estudios realizados mostraron como una adecuada disposición relativa de los centros donadores y aceptores de enlace de hidrógeno en los carbohidratos, permitía el establecimiento de redes cooperativas de enlace de hidrógeno intermoleculares eficaces, tanto en la interacción carbohidrato con el par de bases GC,⁴⁶ como carbohidrato-fosfato,⁴⁷ en medio apolar.

Gracias a estos estudios en disolventes apolares, se pudieron extraer algunas reglas generales para la predicción de las características de una red de enlace de hidrógeno intramolecular y su influencia en un posible proceso de reconocimiento intermolecular. Esto permitió el diseño de carbohidratos que pudiesen establecer redes cooperativas de enlace de hidrógeno intramoleculares, controlando la direccionalidad de la red, en disolventes apolares. Es decir, se pudo controlar el equilibrio conformacional de isómeros de enlace de hidrógeno, provocado por el carácter intrínseco dual, donador y aceptor, de los OH del carbohidrato (Figura 1.11).⁴⁸

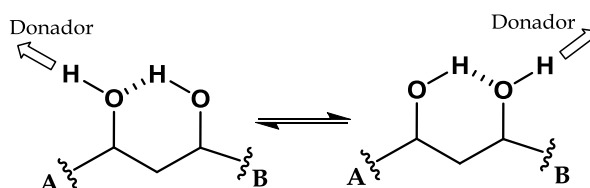


Figura 1.11 Equilibrio conformacional de isómeros de enlace de hidrógeno

La estrategia seguida fue, la introducción estratégica de un grupo funcional determinado, cercano a los OH, que pudiera polarizar los enlaces de hidrógeno en una determinada dirección. Como consecuencia, se potenciaba el carácter donador o aceptor de un OH en concreto, convirtiéndolo en un centro cooperativo de enlace de hidrógeno. De esta forma, se introdujo un grupo amida, cuyo NH iniciaba la red de enlace de hidrógeno como donador, se formaba un ciclo de 5 miembros con el OH próximo del carbohidrato, que actuaba a su vez como aceptor y posible donador de enlace de hidrógeno. Esto genera la posibilidad de que este OH pueda actuar como donador cooperativo en un proceso intermolecular (Figura 1.12A), o que se continúe extendiendo la red cooperativa de enlace de hidrógeno de forma intramolecular dando lugar a un anillo de seis miembros (Figura 1.12 B). Este sistema se puso en práctica empleando *N*-glicosilamidas derivadas de β -D-manosa y β -D-talosa. En el caso del derivado de β -D-manosa, el enlace de hidrógeno entre el NH y el OH en posición 2,

⁴⁵ López de la Paz, M.; Ellis, G.; Pérez, M.; Perkins, J.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 5, 840-855.

⁴⁶ Lopez de la Paz, M.; Gonzalez, C.; Vicent, C. *Chem. Commun.* **2000**, 411-412.

⁴⁷ Muñoz, E. M.; López de la Paz, M.; Jiménez-Barbero, J.; Ellis, G.; Pérez, M.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 1908-1914.

⁴⁸ Vicente, V.; Martín, J.; Jiménez-Barbero, J.; Chiara, J. L.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 4240-4251.

forma un anillo de 5 miembros, mientras que en el caso del derivado de β -D-talosa, la red se extiende dando lugar a un segundo anillo de seis miembros.

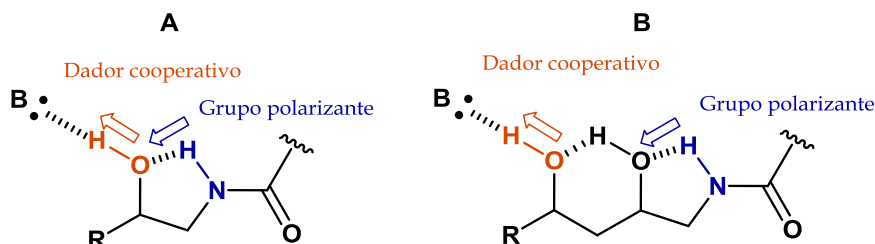


Figura 1.12 Representación esquemática de una red cooperativa de enlace de hidrógeno

El siguiente paso orientado al estudio del reconocimiento del ADN por carbohidratos de nuestro grupo de investigación, consistió en extender los estudios al medio fisiológico, tratando de conseguir la interacción directa de los carbohidratos con ADN. Con ello, se pretendía obtener datos estructurales y termodinámicos acerca de la influencia del carbohidrato en el proceso de reconocimiento carbohidrato-ADN. Posteriormente se introducirían carbohidratos con centros cooperativos de enlace de hidrógeno para poder estudiar la influencia de la cooperatividad en el proceso de reconocimiento. Para lograr acercar el carbohidrato a la doble hélice de ADN, se ideó una estrategia mediante la cual se preparan glicoconjugados constituidos por un carbohidrato sencillo, unido covalentemente a un residuo conocido que sea capaz de unirse específicamente a determinadas secuencias del surco menor del ADN. El uso de un ligando conocido del ADN, como vehículo portador del carbohidrato (vector), resultó ser una metodología eficaz para obtener información estructural valiosa sobre el papel del carbohidrato en la interacción con el ADN.

El diseño del vector que actúa como ligando del surco menor, está basado en las oligoamidas heteroaromáticas sintéticas del código de reconocimiento del ADN establecido por Dervan,⁴⁹ cuyo diseño a su vez, se basa en las estructuras de los antibióticos naturales distamicina y netropsina (Figura 1.13).

⁴⁹ (a) Dervan, P. B. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2215-2235. (b) Dervan, P. B.; Poulin-Kerstien, A. T.; Fechter, E. J.; Edelson, B. S. *Top. Curr. Chem.* **2005**, 253, 1-31.

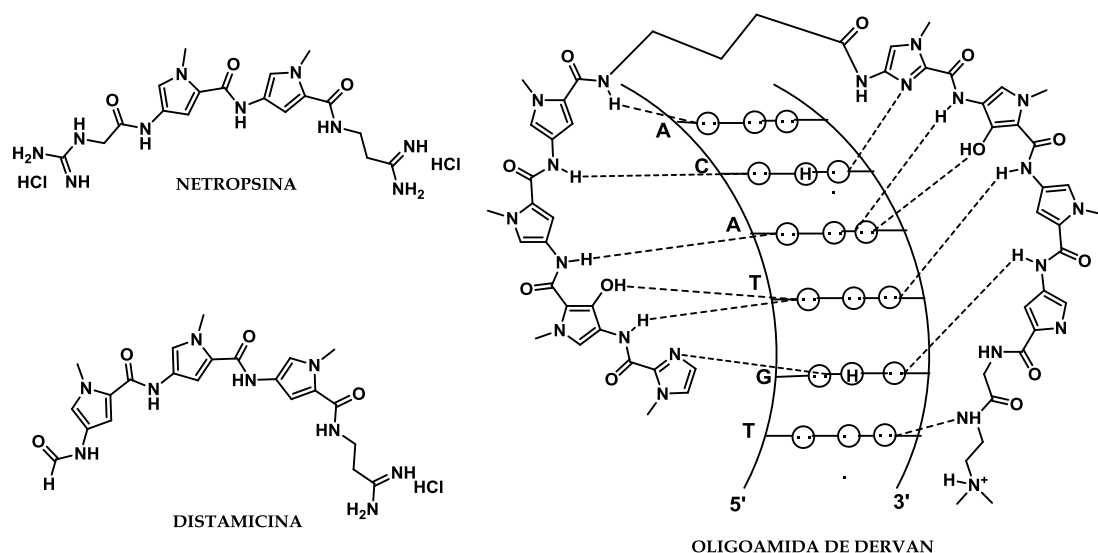


Figura 1.13 Estructuras de los antibióticos netropsina, distamicina y una de las oligoamidas de Dervan

La distamicina y la netropsina son antibióticos con actividad antiviral y antitumoral cuya estructura se compone de *N*-metilpirroles unidos por enlaces amida. Se asocian selectivamente al surco menor del B-ADN, a secuencias ricas en pares de bases de adenina y timina, con constantes de afinidad elevadas, del orden de 10^8 M^{-1} .⁵⁰ Ambas moléculas poseen una forma arqueada que les permite acomodarse al surco menor del ADN a través del establecimiento de interacciones de van der Waals, electrostáticas y enlaces de hidrógeno entre los protones amídicos de los ligandos y los centros aceptores de enlace de hidrógeno presentes en el surco menor.⁵¹ Precisamente, el reconocimiento de secuencias ricas en AT y origen de la selectividad de estos ligandos viene determinado por el establecimiento de dichos enlaces de hidrógeno específicos, entre los protones amídicos de los antibióticos con el oxígeno en posición 2 de timina y el nitrógeno en posición 3 de adenina, tal y como se muestra en la Figura 1.14 a.⁵² Sin embargo, en el caso del par de bases GC, existe un impedimento estérico entre el grupo amino exocíclico de la guanina y el protón 3 del anillo de pirrol perteneciente al ligando, que impide el establecimiento de enlaces de hidrógeno con esas bases (Figura 1.14 b).

⁵⁰ (a) Zimmer, C.; Wähnert, U. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1986**, 47, 31. (b) Marky, L. A.; Breslauer, K. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 4359-4363. (c) Lah, J.; Vesnaver, G. *Biochemistry* **2000**, 39, 9317-9326.

⁵¹ Lavery, R.; Zakrzewska K.; Pullman, B. J. *Biomol. Struct. Dyn.* **1986**, 3, 1155-1170.

⁵² (a) Kopka, M. L.; Yoon, C.; Goodsell, D.; Pjura, P.; Dickerson, R. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 1376-1380. (b) Iida, H.; Jia, G. F.; Lown, J. W. *Curr. Op. Biotech.* **1999**, 10, 29-33.

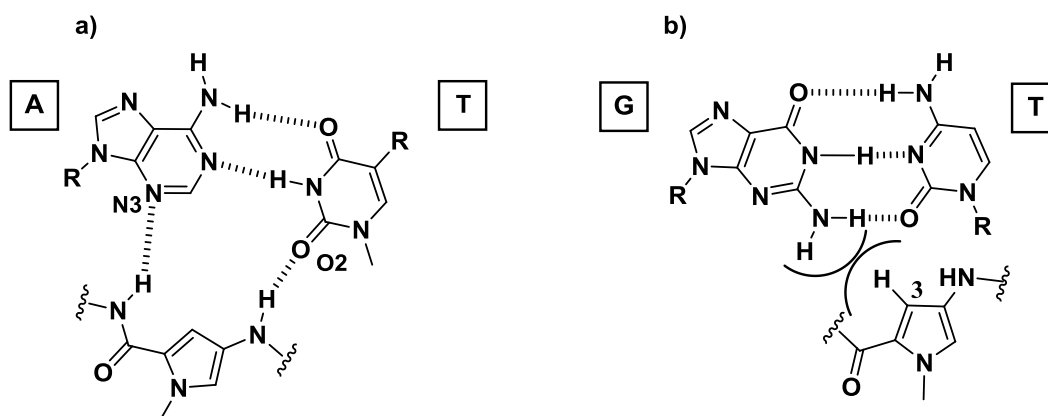


Figura 1.14 a) Representación esquemática de los enlaces de hidrógeno que se establecen entre los protones amídicos de netropsina y distamicina y el par de bases AT. b) Impedimento estérico que tiene lugar entre el grupo amino exocíclico de guanina y H-3 del anillo de pirrol perteneciente a distamicina y netropsina

Estudios de rayos X del complejo 1:1 entre la netropsina y el oligonucleótido 5'-CGCGAATTCGCG-3' mostraron como la molécula curvada de netropsina se adapta al surco menor del B-ADN, desplazando las moléculas de agua, de la llamada espina de hidratación.⁵³ En cuanto a la distamicina, además de formar complejos con estequiometría 1:1, es capaz de asociarse como dímero en una disposición antiparalela de las moléculas de ligando en el surco menor, como demuestra la estructura obtenida por Wemmer mediante RMN, de su complejo con el dodecámero 5'-CGCAAATTGGC-3'.⁵⁴ En la siguiente Figura 1.15, se muestran las estructuras de los distintos complejos, 1:1 y 1:2, de la distamicina.⁵⁵

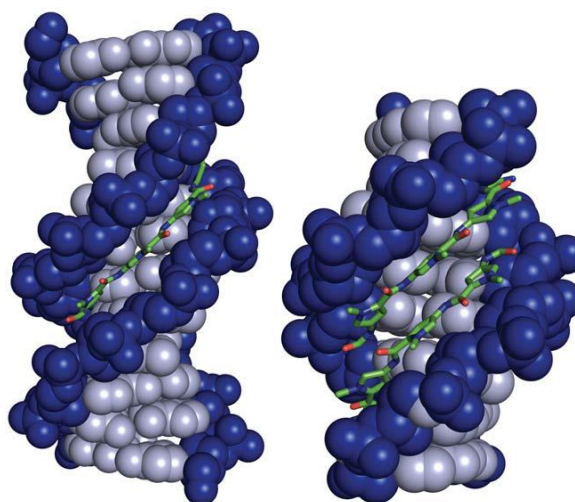


Figura 1.15 Estructuras de la distamicina A unidas al B-ADN, en complejos 1:1 y 1:2 respectivamente (PDB ID: 2DND13 y 378D14)

⁵³ Kopka, M. L.; Yoon, C.; Goodsell, D.; Pjura, P.; Dickerson, R. E. *J. Mol. Biol.* **1985**, 183, 553-563.

⁵⁴ Pelton, J. G.; Wemmer, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1989**, 86, 5723-5727.

⁵⁵ (a) Coll, M.; Frederick, C. A.; Wang, A. H. J.; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, 84, 8385-8389. (b) Mitra, S. N.; Wahl, M. C.; Sundaralingam, M. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1999**, 55, 602-609.

El conocimiento a nivel estructural del proceso de interacción de estos antibióticos con el ADN, ha permitido a Dervan y colaboradores a llevar a cabo el diseño de un código modular de reconocimiento de los pares de bases de Watson y Crick (A, T, G y C) mediante el uso de oligoamidas heteroaromáticas sintéticas derivadas de pirrol e imidazol.⁵⁶ Estos ligandos sintéticos reconocen las características estructurales del surco menor del B-ADN, y codifican un par de bases concreto del mismo. Esta metodología emplea el patrón de aceptores y dadores de enlace de hidrógeno del surco menor como estrategia para lograr esa selectividad en la unión de las oligoamidas al ADN.

En estudios iniciales, Dervan y colaboradores sintetizaron un análogo de distamicina, cambiando uno de los pirroles por un *N*-metilimidazol. Este análogo se unía a una secuencia de 5 pares de bases 5'-WGWCW-3' (donde W = A o T), formando un complejo 2:1, al igual que sucedía con la distamicina.⁵⁷ Las dos moléculas Im-Py-Py formaban un dímero antiparalelo en el surco menor del ADN, con los imidazoles reconociendo el par de bases G·C (Figura 1.16).

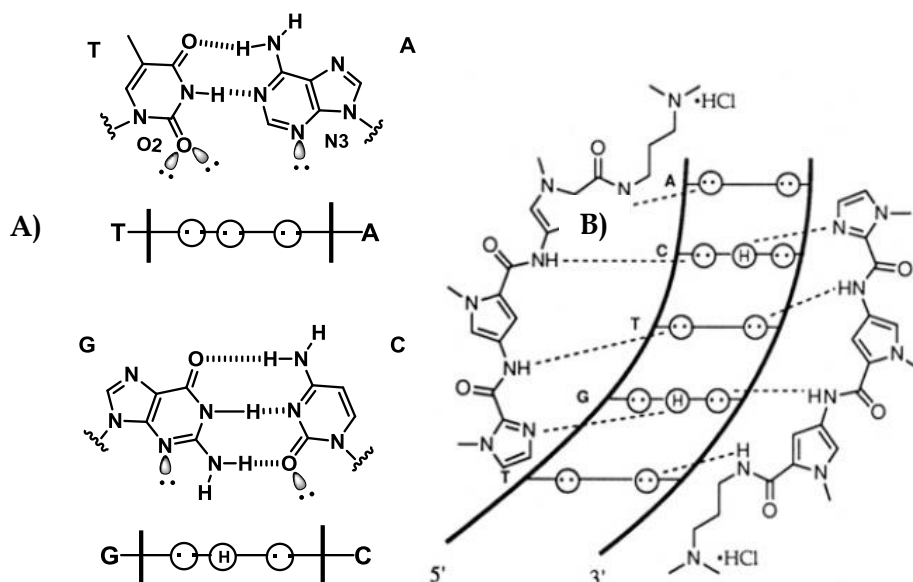


Figura 1.16 A) Patrón de enlaces de hidrógeno del surco menor del ADN. B) Modelo del complejo 2:1 del derivado de Dervan Im-Py-Py con una secuencia 5'-TGTC A-3'. Los círculos con dos puntos muestran los pares de electrones no compartidos de las bases y los círculos con un H, corresponden al NH2 de la guanina. Las líneas punteadas corresponden a los enlaces de hidrógeno.

El enlace de hidrógeno entre el nitrógeno del imidazol y el amino exocíclico de la guanina ayuda a generar especificidad en el reconocimiento de G·C sobre C·G, A·T y T·A.⁵⁸ De esta forma, el par Im/Py, reconoce G·C y el par Py/Im codifica C·G, mientras que el par Py/Py no discrimina entre A·T y T·A (Figura 1.17). Para completar el código y poder reconocer los cuatro pares de bases de Watson y Crick, se introdujo un tercer

⁵⁶ Dervan, P. B.; Edelson, B. S., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, 13, 284-299.

⁵⁷ (a) Wade, W. S.; Mrksich, M.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8783-8794. (b) Mrksich, M.; Wade, W. S.; Dwyer, T. J.; Geierstanger, B. H.; Wemmer, D. E.; Dervan, P. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, 89, 7586-7590.

⁵⁸ Kielkopf, C. L.; Baird, E. E.; Dervan, P. D.; Rees, D. C. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 104-109.

núcleo heteroaromático, el *N*-metilhidroxipirrol. Esta nueva unidad de las oligoamidas, se emparejó con el pirrol, para poder reconocer T·A sobre A·T, gracias a la capacidad del oxígeno de establecer un enlace de hidrógeno bifurcado entre el hidroxilo en posición 3 del anillo aromático con O2 de timina (Figura 1.17).⁵⁹

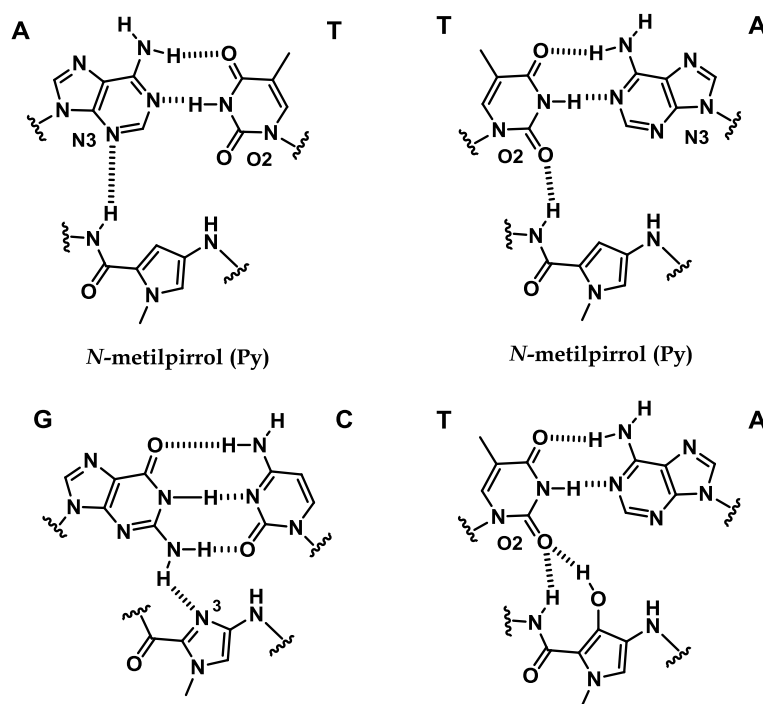


Figura 1.17 Código de reconocimiento de los pares de bases A·T, T·A y G·C por Py, Im y Hp

El desarrollo de estos estudios de Dervan, hacia una mejora tanto en afinidad como en selectividad, llevó a un nuevo diseño de oligoamidas, donde los dos fragmentos de oligoamida que formaban dímeros supramoleculares, se unían covalentemente mediante un conector de tipo alquílico.⁶⁰ Después de sintetizar y evaluar la efectividad de diferentes conectores, se concluyó que el fragmento que mejor afinidad y especificidad daba era una cadena de ácido γ -amino butírico (fragmento γ). Este se enlaza covalentemente al ácido carboxílico terminal de uno de los fragmentos de oligoamida y al amino terminal de la otra subunidad de oligoamida (Figura 1.18), y ha mostrado selectividad por pares de bases A·T/T·A. Además, se ha comprobado que modificaciones en el conector (fragmento γ) contribuyen a la afinidad y a la selectividad de secuencia.⁶¹

⁵⁹ (a) White, S.; Szewczyk, J. W.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Nature* **1998**, 391, 468-471. (b) Kielkopf, C. L.; White, S.; Szewczyk, J. W.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; Rees, D. C. *Science* **1998**, 282, 111-115. (c) Kielkopf, C. L.; Bremer, R. E.; White, S.; Szewczyk, J. W.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B.; Rees, D. C. *J. Mol. Biol.* **2000**, 295, 557-567.

⁶⁰ (a) Mirksich, M.; Parks, M. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7983-7988. (b) Greenberg, W. A.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 796-805. (c) Melander, C.; Herman, D. M.; Dervan, P. B. *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 4487-4497. (d) Heckel, A.; Dervan, P. B. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 3353-3366.

⁶¹ Herman, D. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1382-1391.

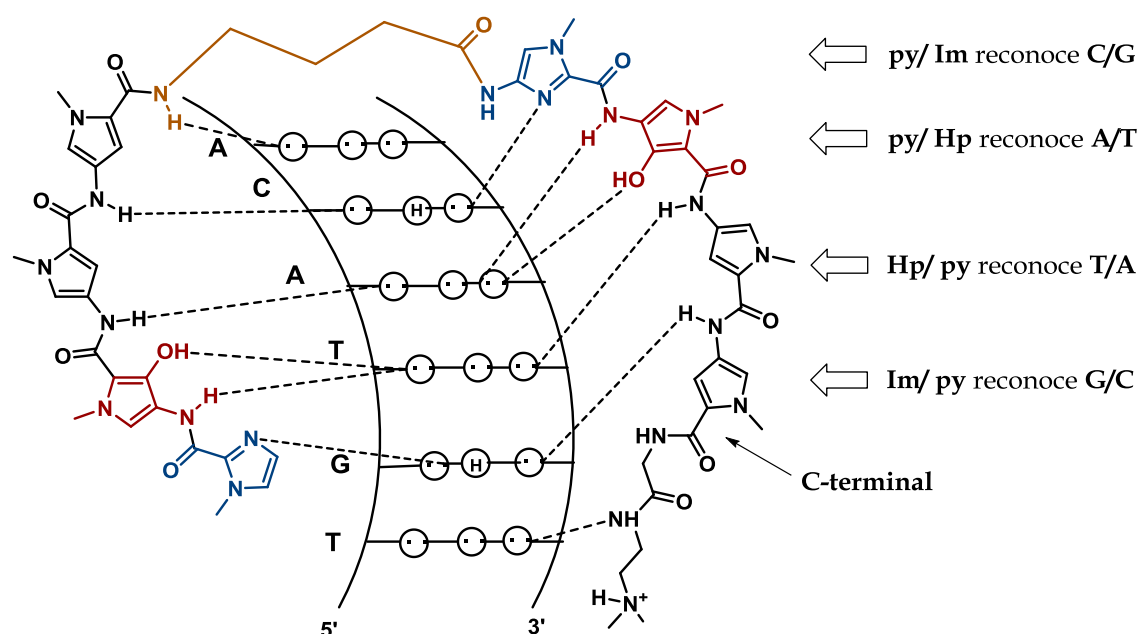


Figura 1.18 Dímero covalente de oligoamida (Im-Hp-py-py- γ Im-Hp-py-py), unido a través de una cadena de ácido γ -aminobutírico por sus extremos C- y N- terminal.

Sobre la conformación que adoptan en el estado asociado, Wemmer y colaboradores han determinado mediante estudios de RMN, que se pliegan en forma de horquilla.⁶² Gracias a la detección de nOes inter-hebra entre anillos aromáticos enfrentados en la molécula, se ha demostrado que las hebras quedan enfrentadas en disposición cabeza-cola, de manera análoga a la disposición que el dímero de distamicina adopta en el estado asociado. Además, se han encontrado nOes intra-hebra entre las resonancias correspondientes a los protones en posición 3 de los anillos de pirrol y los protones amídicos contiguos a éstos en la misma hebra. Estos nOes han determinado que la horquilla presenta una conformación arqueada donde se puede definir un arco interior y otro exterior. Los protones amídicos se sitúan en el arco interior (arco NH) mientras que los oxígenos de los grupos amido y los metilos de los anillos aromáticos se sitúan en el arco exterior (arco NMe) (Figura 1.19). Además, estas oligoamiditas en principio, pueden unirse con dos orientaciones diferentes: alineadas en sentido 5' - 3' en el ADN, con respecto a la dirección N-C terminal (orientación directa), o alineadas en sentido 3' - 5' con respecto a la dirección N-C terminal (orientación reversa). La oligoamiditas de Dervan cuyo fragmento γ no está sustituido, muestran, a nivel energético, una ligera preferencia por la orientación directa.⁶³

⁶² Hawkins, C. A.; Peláez de Clairac, R.; Dominey, R. N.; Baird, E. E.; White, S.; Dervan, P. B.; Wemmer, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5235-5243.

⁶³ White, S.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8756-8765.

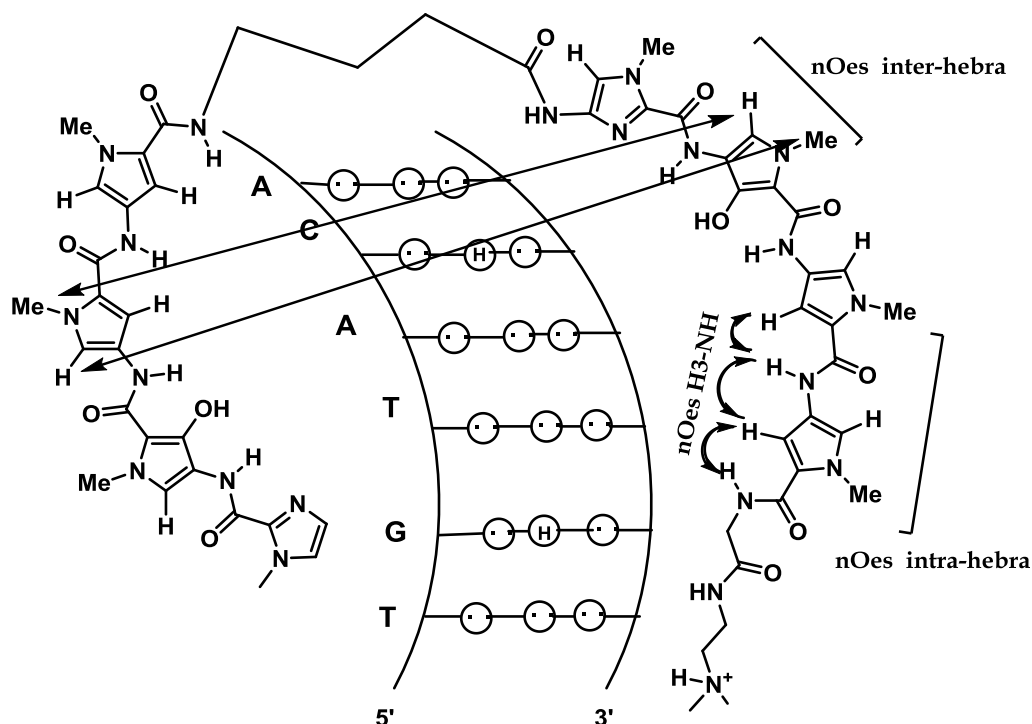


Figura 1.19 *nOes intra- e inter-hebra característicos de la conformación plegada de las oligoamidas en el estado asociado.*

Con este tipo dímeros covalentes de oligoamidas se han logrado afinidades en el rango de nanomolar⁶⁴ y selectividades elevadas. Además, se ha comprobado que modificaciones en el conector (fragmento γ) contribuyen a la afinidad y a la selectividad de secuencia.⁶⁵

La eficacia de las oligoamidas para reconocer una secuencia de ADN determinada, y el conocimiento de las bases estructurales de su interacción y selectividad, hacía de estos ligandos unos candidatos ideales para ser utilizados como estructuras que acercasen carbohidratos al surco menor del B-ADN. Por este motivo se decidió emplear este tipo de ligandos como núcleo central del vector, y unirle covalentemente los carbohidratos, dando lugar a una primera generación de glico-oligoamidas neutras cuya estructura general se muestra en la Figura 1.20.

⁶⁴ (a) Trauger, J. W.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Nature* **1996**, 382, 559-561. (b) Trauger, J. W.; Dervan, P. B. *Methods in Enzymology* **2001**, 340, 450-466.

⁶⁵ Herman, D. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1382-1391.

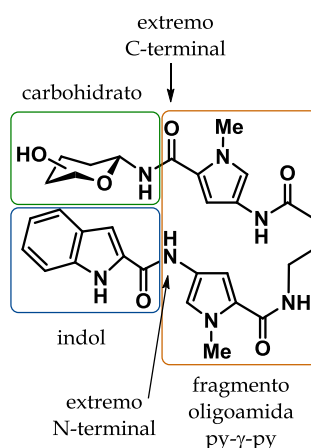


Figura 1.20 Estructura general de las glico-oligoamidas neutras.

Se pretendía mantener la conformación plegada en forma de horquilla de las oligoamidas de Dervan, por lo que la estructura general de las glico-oligoamidas neutras consistió en dos pirroles enfrentados entre sí, unidos mediante una unidad de ácido γ -aminobutírico, para favorecer las interacciones π - π . Además este diseño le confería especificidad por secuencias de bases AT. En el extremo C-terminal del fragmento de oligoamida, se introdujo el carbohidrato unido por su posición anomérica y en el extremo N-terminal se incluyó un anillo de indol, con intención de que se establecieran interacciones CH- π entre ambos, que favorecieran el plegamiento en disolución acuosa. Se seleccionó el anillo de indol como mimético del pirrol, para lograr mantener la curvatura típica de los ligandos del surco menor del ADN, pero al mismo tiempo obteniendo una mayor superficie aromática para favorecer las interacciones CH- π con una de las caras del carbohidrato (α y/o β). Este reconocimiento del indol por una de las caras del carbohidrato, resultará crucial en la disposición adoptada por el carbohidrato con respecto al resto de la molécula y determinará que centros del azúcar se posicionan hacia el interior de la curvatura de la glico-oligoamida (arco NH) y cuales hacia el exterior (NMe). Por lo tanto, a nivel estructural en el complejo con ADN, la disposición relativa del carbohidrato con respecto al resto de la molécula determinará que centros del carbohidrato quedan próximos al interior del surco menor del ADN y cuales se orientan hacia el exterior del surco.

Gracias a esta estrategia diseñada en nuestro grupo de investigación, se ha logrado acercar con éxito diversos carbohidratos sencillos al surco menor del ADN de diversos polímeros de ADN, y obtener información estructural muy valiosa sobre el papel del carbohidrato en la interacción.⁶⁶ Estos ligandos han mostrado preferencia por las secuencias ricas en pares de bases AT, encontrándose afinidades variables en función del anómero y carbohidrato introducido.⁶⁷ Los estructurales de RMN han mostrado que las glico-oligoamidas se unen con una conformación arqueada bien

⁶⁶ Martin, J. N.; Muñoz, E. M.; Schwergold, C.; Souard, F.; Asensio, J. L.; Jimenez-Barbero, J.; Cañada, J.; Vicent, C. J. *Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9518-9533.

⁶⁷ Peñalver, P.; Abdelouahid, S.; Bosch, P.; Hunter, C. A.; Vicent, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2008, 2220-2231.

definida,⁶⁸ similar a la encontrada en las oligoamidas de Dervan y que es necesaria una configuración β del carbohidrato para que este encaje en el surco menor del ADN. Mediante la obtención de nOes inter-hebra, también se ha demostrado la existencia de un porcentaje de conformación plegada en disolución acuosa tanto en estado libre como en el complejo. Los estudios estructurales de RMN del complejo del derivado de D-galactosa con el dodecámero de Dickerson han permitido confirmar su unión al surco menor del ADN, mostrando la cercanía del carbohidrato a la región interna del surco menor (Figura 1.21).⁶⁹

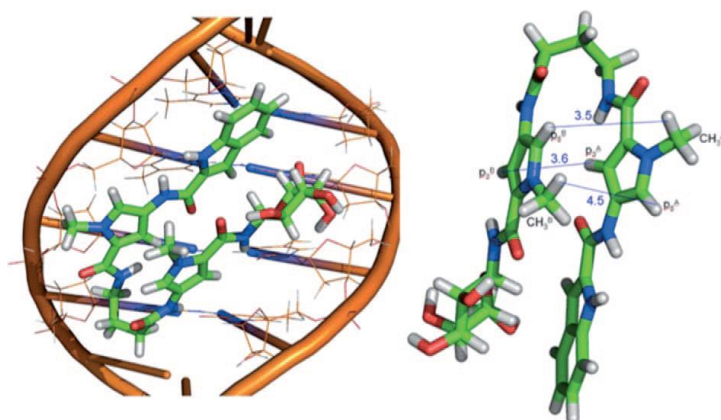


Figura 1.21 Izquierda: perspectiva de la región -AATT- de la estructura promedio (después de minimización) del complejo entre β -D-Gal-Py- γ -Py-Ind/d(CGCGAATTCGCG)₂ obtenida mediante tar-MD a partir de los datos de nOe observados. Derecha: estructura promedio de la glico-oligoamida mostrando las distancias (Å) entre pares de protones claves los cuales definen la conformación en horquilla en el estado asociado al ADN.

Una vez logrado el objetivo de conseguir la interacción directa de carbohidratos sencillos con el surco menor del ADN en medio fisiológico, y dado que los resultados de interacción revelaron que la naturaleza del carbohidrato y su estereoquímica influyen en la interacción con el surco menor del ADN, el siguiente paso en la investigación fue la introducción de carbohidratos con centros cooperativos de enlace de hidrógeno. El objetivo era el establecimiento de redes cooperativas de enlace de hidrógeno tanto intramoleculares, dentro del propio carbohidrato, como su participación en un proceso intermolecular con el ADN. De esta forma se podían trasladar los estudios previos del grupo, de cooperatividad de enlace de hidrógeno, con sistemas más sencillos, realizados en medios apolares, a sistemas más complejos, y más similares a lo encontrado en la naturaleza. Así, se sintetizaron y estudiaron glico-oligoamidas neutras derivadas de D-manosa y D-talosa, ambas con el OH2 del carbohidrato en axial, necesario para que se establezca el enlace de hidrógeno unidireccional con el NH de la amida anomérica (Figura 1.22). De manera relevante, cabe destacar, que en estos estudios se confirmó la presencia de los enlaces de hidrógeno en agua, mediante experimentos de RMN en las glico-oligoamidas en el

⁶⁸ Souard, F.; Muñoz, E.; Peñalver, P.; Badía, C.; del Villar-Guerra, R.; Asensio, Juan L.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2435-2442.

⁶⁹ Peñalver, P.; Marcelo, F.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4561-4570.

estado libre.⁷⁰ Además, la conformación plegada en forma de horquilla de dichas glico-oligoamidas resultó estar más definida que la correspondiente a sus análogas con el OH2 en ecuatorial, derivadas de D-glucosa y D-galactosa, sin posibilidad de formar enlace de hidrógeno. Así, se abrió la posibilidad de estudiar una posible cooperatividad positiva entre interacciones supramoleculares: enlace de hidrógeno e interacciones CH- π .

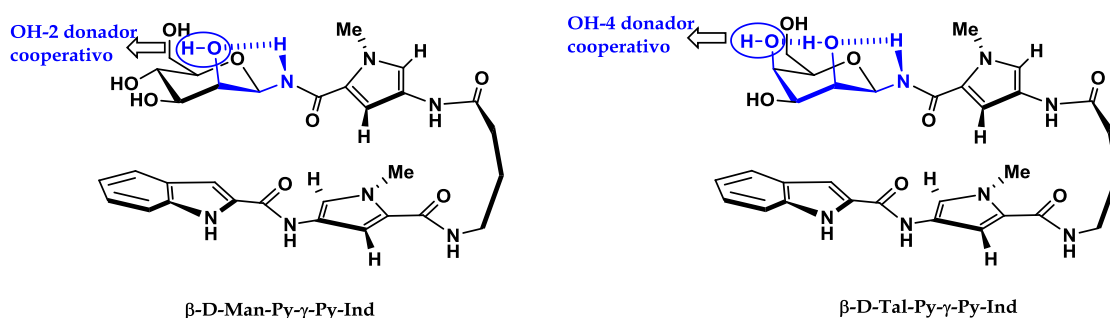


Figura 1.22 Glico-oligoamidas β -D-man-Py- γ -Py-Ind y β -D-tal-Py- γ -Py-Ind con motivos de enlace de hidrógeno intramoleculares de anillo de 5 miembros (ec, ax) en el derivado de manosa (izquierda) y de 5 y 6 miembros (ax, ax) en talosa.

Además, con intención de estudiar la influencia de la quiralidad del carbohidrato, con respecto a su interacción con ADN, también se sintetizaron glico-oligoamidas con carbohidratos de la serie L. De esta forma se realizó un estudio comparativo de glico-oligoamidas conteniendo carbohidratos de la serie D y de la serie L respectivamente, encontrándose diferencias interesantes entre ambos derivados en el estado asociado con ADN.⁷¹

Gracias a estos últimos estudios con las glico-oligoamidas que contienen carbohidratos con centros cooperativos de enlace de hidrógeno, se puso de manifiesto la necesidad de cuantificar la interacción. El diseño presentaba ciertas restricciones que limitaban el avance del estudio para intentar averiguar si había una contribución extra de la cooperatividad de enlace de hidrógeno en la unión con el ADN. Las glico-oligoamidas neutras no eran lo suficientemente solubles en agua, ni presentaban la suficiente afinidad por el ADN como para caracterizar termodinámicamente el proceso de interacción. Este estudio termodinámico mediante microcalorimetría, de dicha interacción es de vital importancia para una comprensión total de las bases atómicas que regulan el reconocimiento del ADN. De este modo surge la exigencia de adaptar nuestro sistema para poder dar un paso más en la investigación del conocimiento de las bases moleculares que regulan el reconocimiento carbohidrato-ADN y la posible implicación de la cooperatividad de enlace de hidrógeno y quiralidad en dicho proceso.

⁷⁰ Blázquez-Sánchez, M. T.; Marcelo, F.; Fernández-Alonso, M. C.; Poveda, A.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 17640-17652.

⁷¹ Blázquez-Sánchez, M. T.; Marcelo, F.; Fernández-Alonso, M. d. C.; del Villar-Guerra, R.; Samadi, A.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 2015, 6180-6193.

1.3 Diseño del nuevo vector catiónico

Como se ha mencionado, el vector neutro presentaba algunas limitaciones, principalmente, sus bajas constantes de asociación y su baja solubilidad en agua, lo que limitaba el uso de otras técnicas biofísicas. Hasta el momento, el uso de este vector había permitido obtener un orden de afinidades relativas entre las diferentes glico-oligoamidas neutras e información estructural muy relevante mediante la RMN. Sin embargo, no había sido posible cuantificar completamente la interacción de las glico-oligoamidas neutras con los polímeros de ADN, ni obtener parámetros termodinámicos del proceso de interacción mediante microcalorimetría. Tampoco había sido posible realizar experimentos de complejación con oligonucleótidos en lugar de con polímeros de ADN. Para solucionar estos problemas, una de las hipótesis de trabajo que se planteó, fue la introducción de un grupo con una carga positiva en la estructura general del vector neutro, de manera que se generase un vector análogo catiónico. De este modo, la modificación de la estructura del vector sería mínima, a la vez que se incrementaría su solubilidad en agua y se establecería una interacción electrostática que supondría un aumento de la constante de asociación del vector con el carbohidrato y el ADN. La mínima modificación del vector abriría la posibilidad de extrapolar varios de los resultados obtenidos previamente, permitiendo la predicción del comportamiento del nuevo vector y la posterior comparación de resultados con los previamente obtenidos. Las sustituciones en los pirroles se descartaron, puesto que eran elementos cruciales en el reconocimiento de las secuencias AT del ADN, y la introducción de un sustituyente en el indol podía afectar a las interacciones CH- π que promueven el plegamiento de la molécula. Por estos motivos, se planteó la introducción del nuevo grupo funcional en una de las posiciones del conector de los dos pirroles (fragmento γ).

Como ya se ha comentado, estudios recientes llevados a cabo por Dervan y colaboradores, muestran cómo es posible variar las propiedades de unión de oligoamidas heteroaromáticas con el ADN realizando sustituciones en el conector o fragmento γ .⁷² La sustitución del ácido γ -aminobutírico como conector por el ácido 2(R),4- diaminobutírico en oligoamidas de seis anillos aromáticos, conlleva un aumento de afinidad de 10 veces con respecto a su análogo neutro y la acetilación del grupo amino, no provoca un aumento de afinidad pero tampoco una pérdida con respecto al análogo neutro (Figura 1.23). El grupo amino se encuentra protonado como NH_3^+ en el pH (pH 7.2) al cual se realizan los experimentos, por lo que se establece interacciones electrostáticas adicionales con los grupos fosfato del ADN.⁷³ Cuando se introduce el enantiómero S en lugar del R, hay una disminución significativa de afinidad con respecto a los derivados del enantiómero R y al análogo neutro. Esto demuestra que la quiralidad del sustituyente del fragmento γ , influye notablemente en la afinidad de las oligoamidas.

⁷² Farkas, M. E.; Li, B. C.; Dose, C.; Dervan, P. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 3919-3923.

⁷³ (a) Herman, D. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1382-1391. (b) Hsu, C. F.; Phillips, J. W.; Trauger, J. W.; Farkas, M. E.; Belitsky, J. M.; Heckel, A.; Olenyuk, B. Z.; Puckett, J. W.; Wang, C. C. C.; Dervan, P. B. *Tetrahedron* **2007**, 6146-6151.

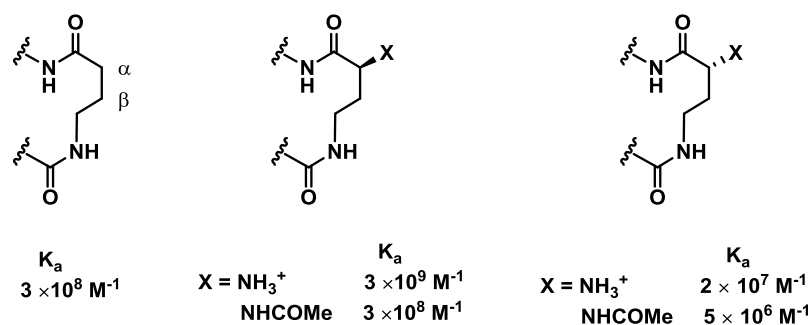


Figura 1.23

Además estudios de *footprinting* demuestran, que no solo se ve afectada la afinidad con la sustitución quiral del fragmento γ , sino también la orientación de la unión de la oligoamida. Mientras que los derivados neutros y los que poseen el sustituyente en configuración *R*, se unen en sentido directo, es decir 5' - 3' en sentido N-C, los derivados sustituidos con una configuración *S* se unen de manera reversa, 3' - 5' en sentido N-C. En principio, para estas oligoamidas existen dos plegamientos no superimponibles, que se relacionan mediante un plano de simetría. Un plegamiento es responsable de la orientación 5' - 3' en sentido N-C, mientras que el otro corresponde 3' - 5' en sentido N-C, orientación reversa (Figura 1.24).

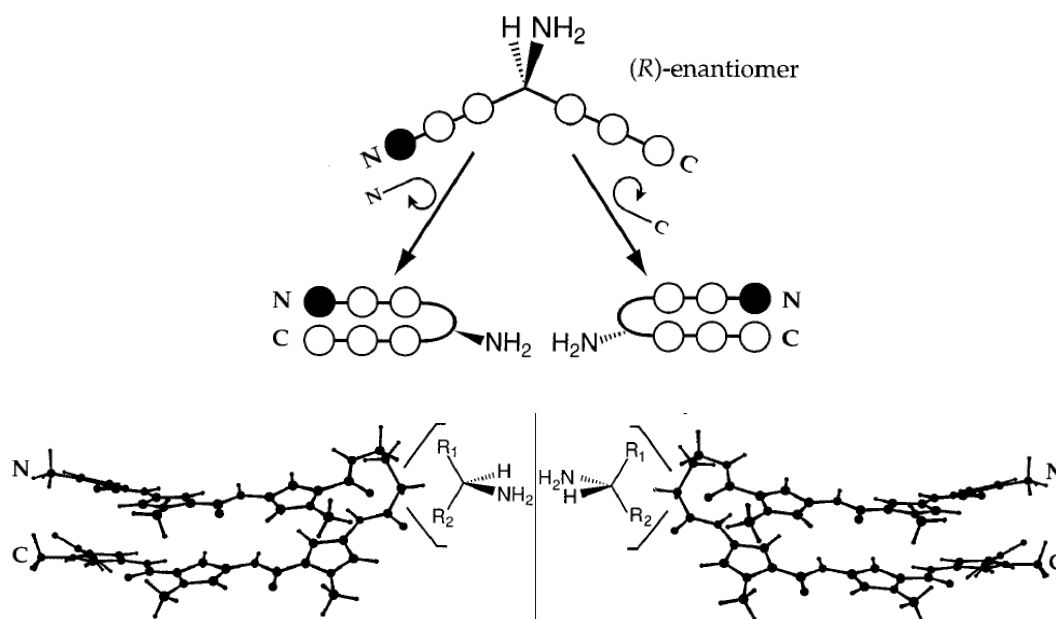


Figura 1.24 Modelo para el plegamiento de poliamidas quirales. Plegamiento N→C (derecha) y C→N (izquierda) en el reconocimiento por ADN en la dirección 5'-3' de la doble hélice.

El origen de esta diferencia puede residir en la distinta estabilización de los complejos formados con una orientación o la contraria. Para una oligoamida aquiral en ausencia de ADN, cada plegamiento debería ser energéticamente equivalente. Sin embargo para las oligoamidas quirales cada plegamiento puede tener potencialmente diferente energía (Figura 1.24). En el plegamiento en sentido 5' - 3', en la dirección N-C para el derivado *R*, el grupo amino se sitúa orientado hacia fuera del surco menor del ADN. Sin embargo en el mismo plegamiento del enantiómero *S*, el grupo amino se

orienta hacia el interior del surco, generando un impedimento estérico con la base del surco. En el caso del plegamiento contrario, es el enantiómero *S* el que coloca el grupo amino hacia el exterior del surco menor del ADN y el *R* el que lo sitúa hacia la base interna del surco menor. Este estudio ha demostrado la relevancia del diseño en el fragmento γ , siendo la naturaleza y quiralidad del sustituyente fundamental en el comportamiento y propiedades de la correspondiente oligoamida.

Sugiyama y colaboradores también han realizado modificaciones en la posición α del fragmento γ de sus oligoamidas, en esta ocasión, buscando una discriminación en la selectividad de pares de bases originada por el conector. Para ello introdujeron un grupo hidroxilo, tanto el enantiómero *R* como el *S*, que estableciera enlaces de hidrógeno específicos con los pares de bases y compararon los resultados con los obtenidos de compuestos análogos derivados de la introducción de un grupo amino en la misma posición α .⁷⁴ Curiosamente, en esta ocasión, fue el enantiómero *S* con el cual se lograron los mejores resultados de selectividad, incrementando la selectividad de secuencia hacia pares de bases T·A sobre pares de bases A·T en 25 veces. No obstante, esto supuso una disminución en las constantes de asociación comparadas con las obtenidas para su con ácido 2(*R*),4-diaminobutírico.

Además de las sustituciones iniciales en posición α , Dervan y colaboradores también han estudiado oligoamidas heteroaromáticas de 8 anillos aromáticos cuyo fragmento γ está sustituido en posición β . Es decir, en lugar de incluir una unidad de ácido 2,4-diaminobutírico, se incorpora el ácido 3,4-diaminobutírico (Figura 1.25). Estos nuevos derivados sustituidos en posición β muestran tanto afinidades relativas mayores, como selectividades de secuencia mejoradas para ambos enantiómeros (3*R* y 3*S*) con respecto a sus análogos sustituidos en posición α , aunque también depende de la secuencia a la cual se unen. Dentro de la sustitución en posición β , no existen diferencias notables en la contribución a la estabilización de la doble hélice de ADN, entre ambos enantiómeros. Sin embargo, en el caso del enantiómero *S*, la acetilación del grupo amino influye notablemente en su afinidad con el ADN disminuyéndola, mientras que la acetilación del enantiómero *R* tiene un efecto mínimo su interacción con el ADN.

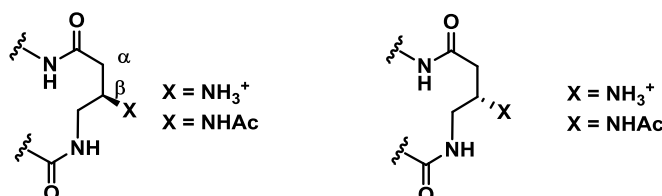


Figura 1.25

En cuanto a selectividad de secuencia se refiere, los estudios de desnaturalización térmica de los distintos complejos con ADN, han demostrado que la selectividad del fragmento γ de poliamidas que contienen una unidad ácido 3,4-diaminobutírico

⁷⁴ Zhang, W.; Minoshima, M.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14905-14912.

muestran una escala de preferencia de secuencia de este tipo: A·T > T·A >> C·G > G·C. Sin embargo, sus análogos derivados del ácido γ -aminobutírico y del 2,4-diaminobutírico, no han mostrado discriminación entre pares de bases A·T / T·A. De nuevo se demuestra la importancia del diseño del conector entre ambos fragmentos de oligoamida, no solo es relevante la naturaleza del sustituyente, sino también la quiralidad y la posición de este.

En base a esta revisión bibliográfica de las posibles modificaciones realizadas por Dervan y Sujiyama, que muestra como pequeñas modificaciones en el fragmento γ tienen un importante efecto en la interacción, y dado que nuestro interés final se centra en el estudio del reconocimiento carbohidrato-ADN, se consideró que la mejor opción para la modificación mínima de nuestro vector neutro era la introducción de un grupo amino en la posición β del fragmento γ (Figura 1.26). Las oligoamidas de Dervan con el grupo amino en dicha posición son las que mayor afinidad han mostrado, además de mostrar mayor selectividad de secuencia. Se optó por una configuración del sustituyente *R*, ya que de acuerdo con los estudios de Dervan, modificaciones en ese grupo con quiralidad *R* no afectaban a sus propiedades de unión. Además, la introducción de este grupo amino, que se encuentra protonado a pH 7.2, podría aumentar la solubilidad en agua de las nuevas glico-oligoamidas. También cabe la opción de lograr aislarlo como sal, para favorecer el proceso de solubilización en agua.

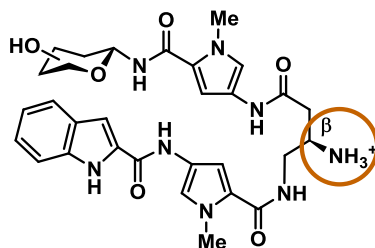


Figura 1.26 Estructura de las nuevas glico-oligoamidas catiónicas carbohidrato-Py- γ 3(R)NH₃⁺]-Py-Ind

Por lo tanto, con esta modificación se espera lograr aumentar tanto la solubilidad, como su afinidad hasta en un orden de magnitud, a la vez que mantener su preferencia por pares de bases AT.

1.4 Introducción de carbohidratos con centros cooperativos de enlace de hidrógeno

Una vez se compruebe la eficacia y la mejora del nuevo vector neutro, la intención es introducir carbohidratos con centros cooperativos de enlace de hidrógeno que puedan participar en un posible proceso cooperativo intermolecular con el ADN. En esta ocasión, la investigación se centrará en la generación de un motivo de enlace de hidrógeno de cinco miembros, donde el NH del grupo amida establece un enlace de hidrógeno unidireccional con el hidroxilo cercano. Debido a la naturaleza dual dadora

/aceptora de enlace de hidrógeno de los hidroxilos, este puede ser capaz de actuar como un centro dador cooperativo en un proceso intermolecular con el ADN.

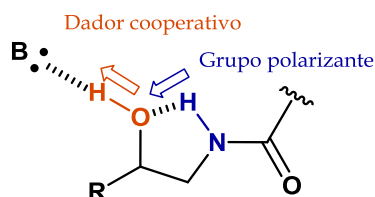


Figura 1.27 Representación esquemática de la red cooperativa de enlace de hidrógeno de cinco miembros

Como ya se ha descrito, la manosa es un carbohidrato que al tener el OH2 posición axial, por cercanía es capaz de establecer un enlace de hidrógeno con el NH de la amida anomérica, siempre y cuando esta amida se encuentre en posición β , dando lugar al anillo de cinco miembros. Este hidroxilo podría actuar a su vez como dador cooperativo de enlace de hidrógeno e interaccionar con los aceptores del surco menor del ADN, si se coloca de la forma adecuada. Por lo tanto se sintetizará la glico-oligoamida catiónica derivada de la D-manosa (β -D-man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind), para evaluar el efecto de la cooperatividad en la interacción con el ADN.

Los estudios previos con las glico-oligoamidas neutras han puesto de manifiesto, que un aspecto importante en el reconocimiento de la doble hélice de ADN, es la quiralidad del carbohidrato. Se han observado variaciones tanto en afinidad como a nivel estructural en los complejos con polímeros de ADN, en función de si el carbohidrato es de la serie D o de la serie L. Así, para profundizar en el estudio, se sintetizará también la glico-oligoamida catiónica derivada de L-manosa (β -L-man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind).

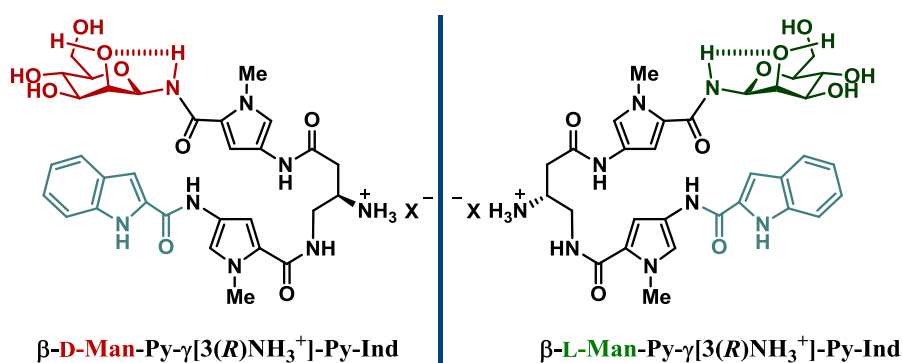


Figura 1.28 Nuevas glico-oligoamidas catiónicas derivadas de D y L manosa

1.5 Objetivos

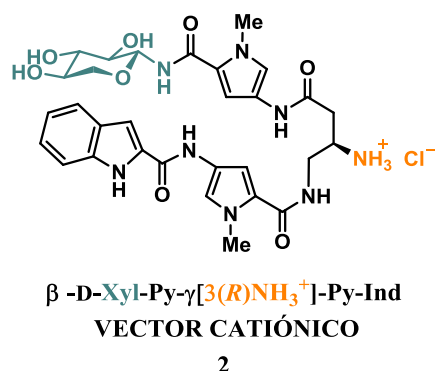
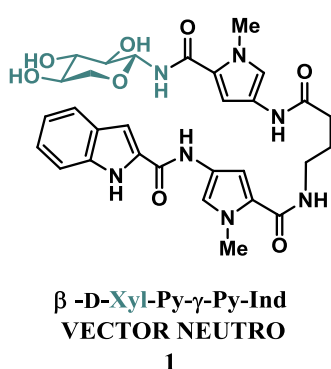
Los dos objetivos principales de esta tesis son, en primer lugar la mejora del diseño del vector portador del carbohidrato, aumentando su solubilidad en agua y su afinidad por el surco menor del ADN. En segundo lugar, el establecimiento de redes de enlace

de hidrógeno intramoleculares para la generación de centros dadores de enlace de hidrógeno cooperativos en el carbohidrato, que sean efectivos en agua y el estudio de su influencia en procesos de reconocimiento molecular carbohidrato-ADN. Para ello se incorporaran carbohidratos de distinta quiralidad (D y L), con redes de enlace de hidrógeno intramoleculares polarizadas en un sentido, en el nuevo vector catiónico, dando lugar a una serie de nuevas glico-oligoamidas catiónicas. Se caracterizarán en disolución acuosa mediante RMN, y se estudiará su interacción con ADN mediante diferentes técnicas biofísicas.

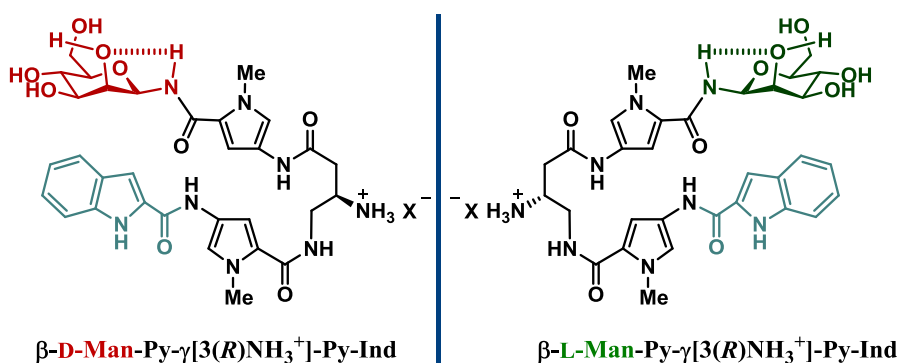
Por lo tanto, esta tesis está dividida en varios capítulos que abordan diferentes cuestiones bien diferenciadas, cuyos objetivos específicos se detallan a continuación.

1.5.1 Objetivos del capítulo 2: Síntesis de nuevas glico-oligoamidas catiónicas.

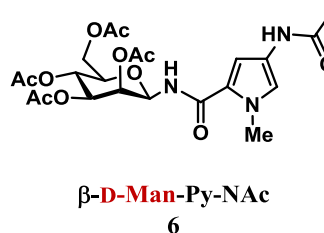
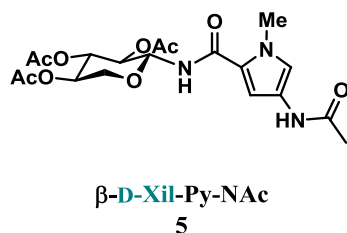
- Diseño y optimización de una ruta sintética eficaz para la síntesis del nuevo vector catiónico y por tanto de las nuevas glico-oligoamidas catiónicas.
- Síntesis de la glico-oligoamida catiónica derivada de D-xilosa y su análoga neutra (1 y 2).



- Síntesis de las glico-oligoamidas catiónicas derivadas de D y L-manosa (3 y 4) que contienen centros cooperativos de enlace de hidrógeno.



- Además, para estudiar la influencia de la hebra indol sobre el carbohidrato, y con fines comparativos, se propone la síntesis de los modelos hebra carbohidrato derivados de D-xilosa y D-manosa (5 y 6).



1.5.2 *Objetivos del capítulo 3: Estudio comparativo de las propiedades conformacionales y de interacción con ADN de la glico-oligoamida neutra y la glico-oligoamida catiónica.*

En este capítulo se plantea un estudio comparativo entre las glico-oligoamidas neutra y catiónica derivadas de D-xilosa.

- En primer lugar se planteará un estudio de solubilidad en agua, para comprobar si ha habido mejora en la solubilidad de la glico-oligoamida catiónica respecto de la neutra.
- Se realizará un estudio conformacional de la glico-oligoamida catiónica de xilosa (β -D-xil-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind) en agua mediante RMN. Con los resultados se realizará una comparación con su análoga neutra.
- Una vez caracterizada la conformación en agua de la glico-oligoamida catiónica, se llevarán a cabo experimentos de interacción con polímeros de ADN para evaluar si se ha producido una mejora en la afinidad con respecto al derivado neutro. Además también se comprobará si la nueva glico-oligoamida catiónica también presenta preferencia por pares de bases AT y se estudiará su modo de unión.
- Se realizaran estudios conformacionales de los diferentes complejos de la glico-oligoamida derivada de D-xilosa con los correspondientes polímeros de ADN. Se prestará especial atención al fragmento del carbohidrato.

1.5.3 *Objetivos del capítulo 4: Glico-oligoamidas catiónicas con carbohidratos con centros dadores de enlace de hidrógeno.*

En este capítulo se detalla el estudio conformacional de las glico-oligoamidas catiónicas que contienen carbohidratos con centros cooperativos de enlace de hidrógeno y su interacción con polímeros de ADN.

- Estudio conformacional de las glico-oligoamidas derivadas de D y L-manosa [β -D-man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) y β -L-man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4)] en agua mediante RMN.
- Caracterización de la posible red intramolecular de enlace de hidrógeno en agua de dichas glico-oligoamidas catiónicas mediante RMN. Además, por motivos comparativos, se incluirán en el estudio tanto la glico-oligoamida

derivada de D-xilosa [β -D-xil-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2)], como los modelos de hebra carbohidrato β -D-xil-Py-NHAc (5) y β -D-man-Py-NHAc (6).

- Se harán estudios de interacción de las glico-oligoamidas derivadas de D y L-manosa (3 y 4) con distintos polímeros de ADN para evaluar el proceso de cooperatividad de enlace de hidrógeno. Se estudiará su afinidad por las diferentes pares de bases y su selectividad de secuencia mediante diversas técnicas biofísicas, como RMN y microcalorimetría.
- Además se llevará a cabo un estudio estructural de los complejos glico-oligoamida-ADN obtenidos, mediante RMN.

1.5.4 *Objetivos del capítulo 5: Procesos de agregación supramolecular de glico-oligoamidas catiónicas en agua.*

- En este capítulo se proponen estudios orientados al entendimiento del proceso de agregación de las glico-oligoamidas catiónicas en agua, detectado inicialmente por microcalorimetría.
- Se pretende obtener información sobre el tipo de agregado, su morfología y las condiciones del medio por las cuales se ve afectado, mediante técnicas de caracterización de agregados de elevado peso molecular, como DLS y microscopía electrónica.
- También se intentará evaluar en qué medida afecta el proceso de agregación al proceso de unión al ADN y si es posible la observación del proceso mediante RMN (experimentos de difusión, DOSY).

2. CAPÍTULO 2

SÍNTESIS DE NUEVAS GLICO-OLIGOAMIDAS CATIONICAS

2.1 Introducción

La síntesis de las glico-oligoamidas siempre supone un reto. La complejidad de la síntesis de carbohidratos, sumada a los problemas de la síntesis de oligoamidas heteroaromáticas (baja solubilidad y tediosas purificaciones), hace que cada una de las síntesis de este tipo de glico-conjugados entrañe cierta dificultad. El objetivo de este capítulo es diseñar y optimizar una ruta sintética adecuada, para llevar a cabo la síntesis de las nuevas glico-oligoamidas catiónicas. Se quiere obtener una ruta versátil para poder introducir diversidad estructural tanto en el fragmento γ como en el azúcar, siendo crucial en el desarrollo de nuestra síntesis la formación del enlace amida.

El enlace amida no es solo una unión clave en proteínas y sistemas biológicos,¹ sino también, la base de polímeros sintéticos versátiles muy usados, y con numerosas aplicaciones.² Además, el grupo amida juega un papel importante en el campo de la química médica, llegando a aparecer en más del 25% de los fármacos del mercado³ y encontrándose en dos tercios de los candidatos a fármacos, según un sondeo llevado a cabo por tres empresas farmacéuticas líderes.⁴ Las propiedades favorables del enlace amida, como su polaridad, estabilidad, diversidad conformacional y su naturaleza tanto dadora como aceptora de enlace de hidrógeno, hacen de él uno de los grupos funcionales más populares en todos los ámbitos de la química orgánica. Por ello, las reacciones químicas que permiten su síntesis constituyen una de las transformaciones más empleadas en química orgánica, y al contrario de lo que se pueda pensar, siguen suponiendo un importante reto sintético en muchos casos.⁵

2.1.1 Síntesis de oligoamidas heteroaromáticas

El diseño del código de reconocimiento por parte de Dervan y colaboradores,⁶ basado en oligoamidas heteroaromáticas y el desarrollo de sus aplicaciones, generó la necesidad de progresar en cuanto a la metodología para su síntesis. Hasta ese momento no había una estrategia definida para la síntesis de oligoamidas heteroaromáticas. Se habían realizado varias síntesis de distamicina, netropsina y sus análogos mediante técnicas tradicionales.⁷ Sin embargo, los dos enlaces amida de la distamicina se formaban a partir de un ácido carboxílico aromático y una amina también aromática. El ácido carboxílico aromático es propenso a la descarboxilación y

¹ Greenberg, A.; Breneman, C. M.; Liebman, J. F. *The Amide Linkage: Selected Structural Aspects in Chemistry, Biochemistry, and Materials Science*; Wiley-Interscience: New York, NY, USA, 2000.

² Deming, T. J. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 858–875.

³ Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 55–68.

⁴ Carey, J. S.; Laffan, D.; Thomson, C.; Williams, M. T. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2337–2347.

⁵ (a) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827–10852. (b) Constable, D. J. C.; Dunn, P. J.; Hayler, J. D.; Humphrey, G. R.; Leazer, J. J. L.; Linderman, R. J.; Lorenz, K.; Manley, J.; Pearlman, B. A.; Wells, A.; Zaks, A.; Zhang, T. Y. *Green Chem.* **2007**, *9*, 411–420. (c) Valeur, E.; Bradley, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606–631. (d) El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557–6602. (e) Pattabiraman, V. R.; Bode, J. W. *Nature* **2011**, *480*, 471–479. (f) Lundberg, H.; Tinnis, F.; Selander, N.; Adolfsson, H. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 2714–2742.

⁶ White, S.; Szewczyk, J. W.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Nature* **1998**, *391*, 468–471.

⁷ (a) Weiss, M. J.; Webb, J. S.; Smith, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 1266–1266. (b) Bailer, M.; Yagen, B.; Machoulam, P. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 2389–2391.

las aminas aromáticas son, en general, sensibles a la luz y al aire.⁸ El resultado de esto eran reacciones de formación de enlace amida con rendimientos variables, tiempos largos de reacción, generación de intermedios muy reactivos (cloruros de ácido y tricloro cetonas) y por tanto, variedad de subproductos no deseados.⁹ Como solución a esta problemática surgió el uso de la síntesis en fase sólida para la obtención de oligoamidas aromáticas.¹⁰ La metodología en fase sólida ofrece importantes ventajas para síntesis en escala de miligramos, como la rapidez y reproducibilidad de las reacciones de acoplamiento, mayor facilidad en los procesos de purificación y aislamiento debido a la inmovilización de la oligoamida en el soporte sólido y la posibilidad de automatizar el proceso. Por ello, durante años, la mayoría de los avances sintéticos en este campo han ido dirigidos a la síntesis en fase sólida. Sin embargo, esta técnica limita intrínsecamente la escala de síntesis y muchas veces es necesario un exceso de equivalentes de reactivo para obtener buenos rendimientos. La síntesis tradicional en disolución permite acceder a cantidades mayores de oligoamidas, no obstante, es necesario mejorar el proceso mediante la disminución de los tiempos de reacción y evitando, en la medida de lo posible, las arduas purificaciones cromatográficas.

Existen varios ejemplos en literatura de diversas síntesis en disolución¹¹ en donde la formación de los enlaces amida se lleva a cabo mediante diferentes metodologías: activación del ácido mediante formación del cloruro de ácido^{11a} y posterior acoplamiento con la amina correspondiente, formación de tricloroacetilos^{11c} para su posterior condensación con la amina (reacción del haloformo) y activación del ácido *in situ* mediante distintos agentes de acoplamiento.^{11b,e,d,g} En cuanto al aislamiento y purificación se refiere, hasta el momento, solo hay dos publicaciones en las que se lleva a cabo la síntesis de oligoamidas heteroaromáticas sin tener que realizar una purificación cromatográfica. Boger y colaboradores consiguieron sintetizar la distamicina A y múltiples análogos con un simple procedimiento de extracción ácido/base obteniendo purezas del 95% o superiores.^{11d} En el otro ejemplo, el grupo de Dervan desarrolló una metodología que permitió obtener el esqueleto principal de oligoamidas derivadas de pirrol e imidazol sin emplear purificación cromatográfica.^{11g} Su método está basado en las distintas solubilidades de los productos de partida frente

⁸ Lown, J. W.; Krowicki, K. J. *Org. Chem.* **1985**, 50, 3774–3779.

⁹ (a) Church, K. M.; Wurdeman, R. L.; Zhang, Y.; Chen, F.; Gold, B. *Biochemistry* **1990**, 29, 6827–6838. (b) He, G.; Browne, K. A.; Gropee, J. C.; Blasko, A.; Mei, H.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7061–7071.

¹⁰ (a) Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6141–6146. (b) Wurtz, N. R.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Org. Lett.* **2001**, 3, 1201–1203. (c) Krutzik, P. O.; Chamberlin, A. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2129–2132. (d) Krutzik, P. O.; Chamberlin, A. R. *Methods Mol. Biol.* **2002**, 201, 77–92. (e) Ayame, H.; Saito, T.; Bando, T.; Fukuda, N.; Sugiyama, H. *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2003**, 67–68. (f) Moore, M. J. B.; Cuenca, F.; Searcey, M.; Neidle, S. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 3479–3488.

¹¹ (a) Church, K. M.; Wurdeman, R. L.; Zhang, Y.; Chen, F. X.; Gold, B. *Biochemistry* **1990**, 29, 6827–6838. (b) Mrksich, M.; Parks, M. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7983–7988. (c) Xiao, J.; Yuan, G.; Huang, W.; Chan, A. S.; Lee, K. L. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 5506–5513. (d) Boger, D. L.; Fink, B. E.; Hedrick, M. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6382–6394. (e) Mamidyala, S. K.; Firestine, S. M. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 7431–7434. (f) Harris, D.; Stewart, M.; Sielaff, A.; Mulder, K.; Brown, T.; Mackay, H.; Lee, M. *Heterocycl. Commun.* **2007**, 13, 17–23. (g) Chenoweth, D. M.; Harki, D. A.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 7175–7181.

a los productos finales. De esta forma, logra la purificación de intermedios y productos finales mediante la combinación de técnicas como la precipitación, trituración y cristalización. A pesar de los esfuerzos realizados para poder generalizar los principios de preparación de este tipo de compuestos, todos estos métodos han sido optimizados para cada caso, todos tienen ventajas e inconvenientes para valorar y es difícil elegir la estrategia más idónea para la síntesis de una nueva oligoamida heteroaromática.

2.1.2 Antecedentes: síntesis de glico-oligoamidas neutras

A lo largo de los últimos años, nuestro grupo de investigación se ha centrado en desarrollar estrategias sintéticas versátiles y sencillas para poder obtener diversidad estructural en las glico-oligoamidas neutras. Hasta el momento, se habían introducido modificaciones en el carbono terminal, R^1 , (variedad de monosacáridos, aminoácidos como serina y treonina, y derivados de glucosa con serina y treonina) además de cadenas alquílicas en átomo de nitrógeno del pirrol B, que presentaban un hidroxilo o tionilo terminal protegido, manteniendo intacto el fragmento gamma amino butírico (Figura 2.1).¹²

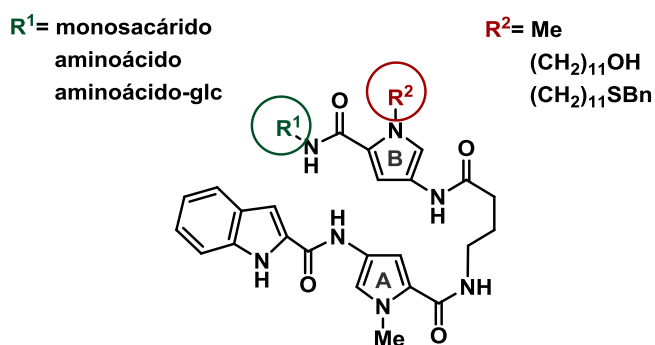
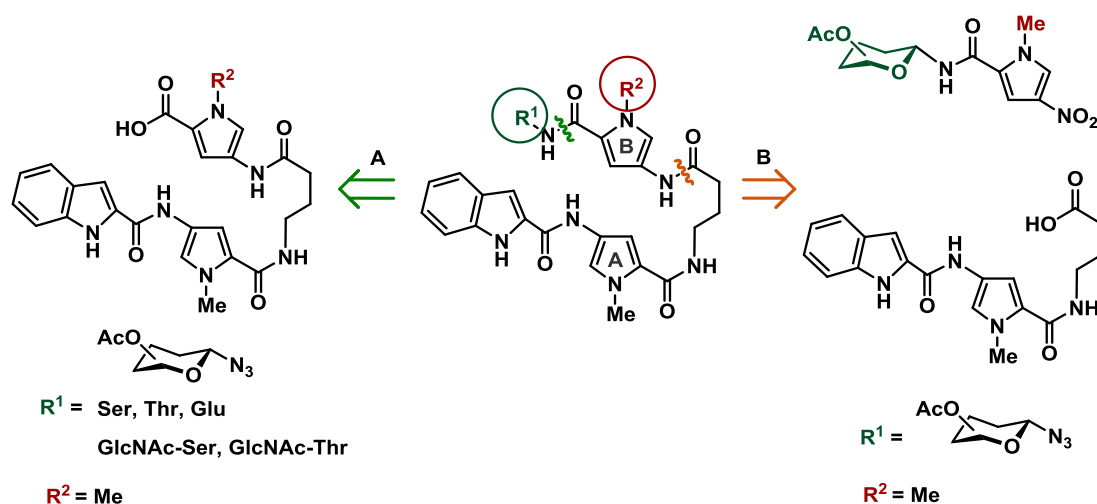


Figura 2.1 Diversidad estructural introducida en las glico-oligoamidas.

Para la obtención de estos derivados se desarrollaron dos rutas sintéticas diferentes, una convergente y otra lineal (Esquema 2.1).

¹² (a) Martin, J. N.; Muñoz, E. M.; Schwergold, C.; Souard, F.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Cañada, J.; Vicent, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9518–9533. (b) Badía, C.; Souard, F.; Vicent, C. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 10870–10881. (c) Del Villar-Guerra, R. *Miméticos de factores de transcripción: herramientas químicas para el estudio de modificaciones post-traduccionales de proteínas nucleares que interaccionan con ADN*. Tesis doctoral, Universidad de Valladolid, España, Junio 2012.



Esquema 2.1 *Análisis retrosintético de las glico-oligoamidas neutras.*

La síntesis convergente (ruta B) fue la primera aproximación para la síntesis de glico-oligoamidas neutras con diferentes monosacáridos. Se sintetizaban las dos hebras por separado y se unían en la formación del enlace amida final usando DIPC y HOBT. El ácido γ amino butírico quedaba incluido en la hebra que posee el indol. Una de las etapas cruciales era la introducción del carbohidrato en la síntesis de la hebra carbohidrato, generándose la amida anomérica. En este punto se formaban los dos posibles anómeros (α y β), de los cuales solo el anómero β era deseado, y fue necesario buscar el momento más conveniente para llevar a cabo su separación.

A la vista de los buenos resultados de interacción obtenidos con las primeras glico-oligoamidas neutras, y ante la perspectiva de ampliar la variedad estructural para poder introducir elementos que diesen lugar a la multivalencia, se decidió realizar un esfuerzo para mejorar la estrategia sintética. En esta ocasión se optó por una ruta lineal (ruta A) en la que se sintetizaba el esqueleto general de la oligoamida (Ind-Py- γ -Py) y en última instancia se incorporaba el monosacárido o aminoácido correspondiente. En el caso de la introducción de carbohidratos, al generar la amida anomérica en la etapa final de síntesis, la separación de anómeros, α y β , se realizaba en el paso previo a la desprotección final de la molécula. La síntesis del ácido oligoamídico se llevaba a cabo siguiendo una metodología de reducción del grupo nitro para generar la amina, y la activación del ácido carboxílico para su posterior acoplamiento para dar lugar al enlace amida. Además, mediante esta ruta se logró introducir diferentes cadenas alquílicas en el átomo de nitrógeno del pirrol B. La principal ventaja de esta ruta fue la posibilidad de sintetizar a gran escala el fragmento correspondiente a la oligoamida y almacenarlo, para después poder obtener numerosos derivados a partir de distintos fragmentos de aminoácidos (miméticos de factores de transcripción) o carbohidratos (glico-oligoamidas neutras).

2.2 Diseño y síntesis de glico-oligoamidas catiónicas

En este capítulo se presenta la síntesis de las nuevas glico-oligoamidas catiónicas (Figura 2.2) que serán empleadas para llevar a cabo los objetivos estructurales y de interacción anteriormente descritos. En primer lugar, se diseñó y optimizó la síntesis del nuevo vector catiónico para compararlo con su análogo neutro. En concreto, se escogió obtener los derivados de xilosa (compuestos **1** y **2**) por ser uno de los ligandos que mejor se unían al ADN en la versión neutra. Una vez comprobada la eficacia del nuevo vector catiónico, interesaba sintetizar los derivados catiónicos que contuviesen carbohidratos con centros cooperativos de enlace de hidrógeno, por lo que se decidió sintetizar la glico-oligoamida que contuviera el monosacárido D-manosa (compuesto **3**). Adicionalmente, para explorar la influencia de la quiralidad del carbohidrato en su unión con el ADN se quiso preparar y estudiar el derivado de L-manosa (compuesto **4**). Con el estudio de esta pareja de diastereómeros derivados de D y L-manosa (**3** y **4**) y su comparación con el derivado de D-xilosa (**2**), se puede estudiar el efecto de la disposición relativa de los hidroxilos en el carbohidrato, gracias a las diferencias estructurales existentes entre ellos.

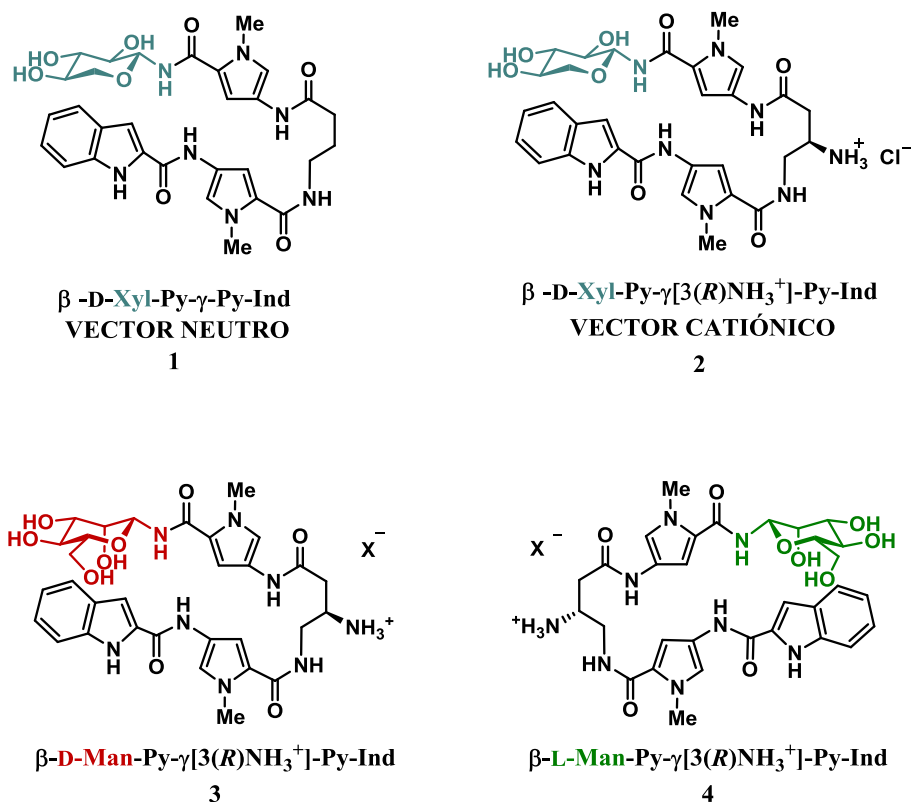


Figura 2.2 Glico-oligoamidas sintetizadas 1-4: vector neutro 1; vector catiónico 2-4.

Además, para realizar estudios estructurales posteriores, también fue necesario sintetizar los correspondientes modelos de hebra de azúcar que se muestran en la Figura 2.3 (compuestos **5** y **6**).

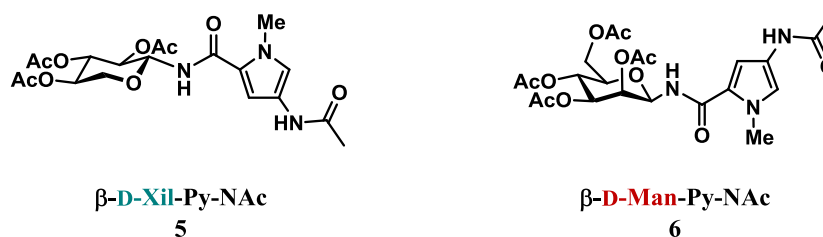


Figura 2.3 Modelos de hebra carbohidrato conteniendo el carbohidrato.

La síntesis de las glico-oligoamidas catiónicas **2**, **3** y **4** se quiso plantear de acuerdo con la estrategia sintética desarrollada anteriormente en el grupo, para las glico-oligoamidas neutras. Una síntesis en disolución, basada en reducciones del grupo nitro para la obtención de las correspondientes aminas y posterior acoplamiento con el ácido carboxílico correspondiente para generar las amidas.

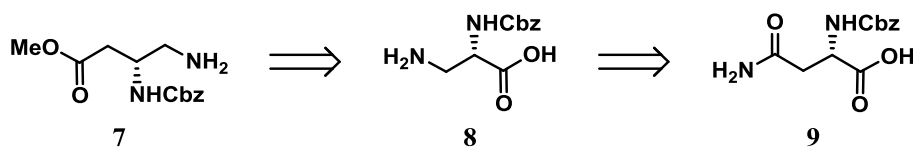
Un punto clave en la síntesis, era la selección de los grupos protectores que se iban a emplear, tanto para los hidroxilos del carbohidrato como para el grupo amino en posición 3 del fragmento γ . Debido a la tendencia a la anomerización del carbohidrato con los hidroxilos libres, y a las posibles reacciones secundarias en las cuales se puede ver involucrado el grupo amino, tales como β -eliminación y epimerización, se decidió mantenerlos protegidos durante toda la síntesis. Como es habitual para la selección del grupo protector, se evaluaron las condiciones de reacción de las distintas etapas, los reactivos y los diversos grupos funcionales implicados en la ruta sintética. Además, se buscaron grupos protectores cuya eliminación transcurriese en condiciones suaves, de manera limpia y eficiente, ya que estas etapas de desprotección conducirían a los productos finales, complicados de aislar y purificar. En el caso del carbohidrato, se optó por emplear grupos acetato para proteger los hidroxilos. Su desprotección se puede llevar a cabo mediante la hidrólisis del éster, en presencia de cantidades catalíticas de metóxido sódico en metanol.¹³ En principio, estas condiciones son lo suficientemente suaves como para evitar posibles reacciones secundarias y no inducen la anomerización del carbohidrato. En cuanto al grupo amino del fragmento γ se decidió protegerlo como carbamato, ya que disminuye el riesgo de epimerización en medio básico.¹⁴ Dentro de los carbamatos, se eligió el grupo benciloxycarbonilo (Cbz) por ser estable frente a gran variedad de medios tanto básicos y como ácidos. La ventaja adicional, es que se elimina mediante hidrogenación catalítica, dando lugar a dióxido de carbono y tolueno, facilitándose su posterior aislamiento y purificación.

Para la obtención del fragmento γ -diaminobutírico, se plantearon dos opciones. El ácido (*R*)-3,4-diaminobutírico enantioméricamente puro, con los grupos amino protegidos ortogonalmente estaba disponible comercialmente, aunque a un elevado coste (Ácido 4-(Boc-amino)-3(*R*)-(Z-amino) butírico, CAS 108919-51-3). Otra posible

¹³ Wang, Z. In *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*; John Wiley & Sons, Inc.: 2010.

¹⁴ Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. In *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Inc.: 2006, p 696.

alternativa, era llevar a cabo la síntesis del éster **7**, la cual había sido descrita en la literatura por Shinagawa y colaboradores.¹⁵ Su método consistía en realizar una homologación de Arndt-Eistert a partir del ácido propiónico **8**, el cual era sintetizado a través de una transposición de Hofmann partiendo del aminoácido N-benciloxycarbonil-L-Asparagina (Esquema 2.2).

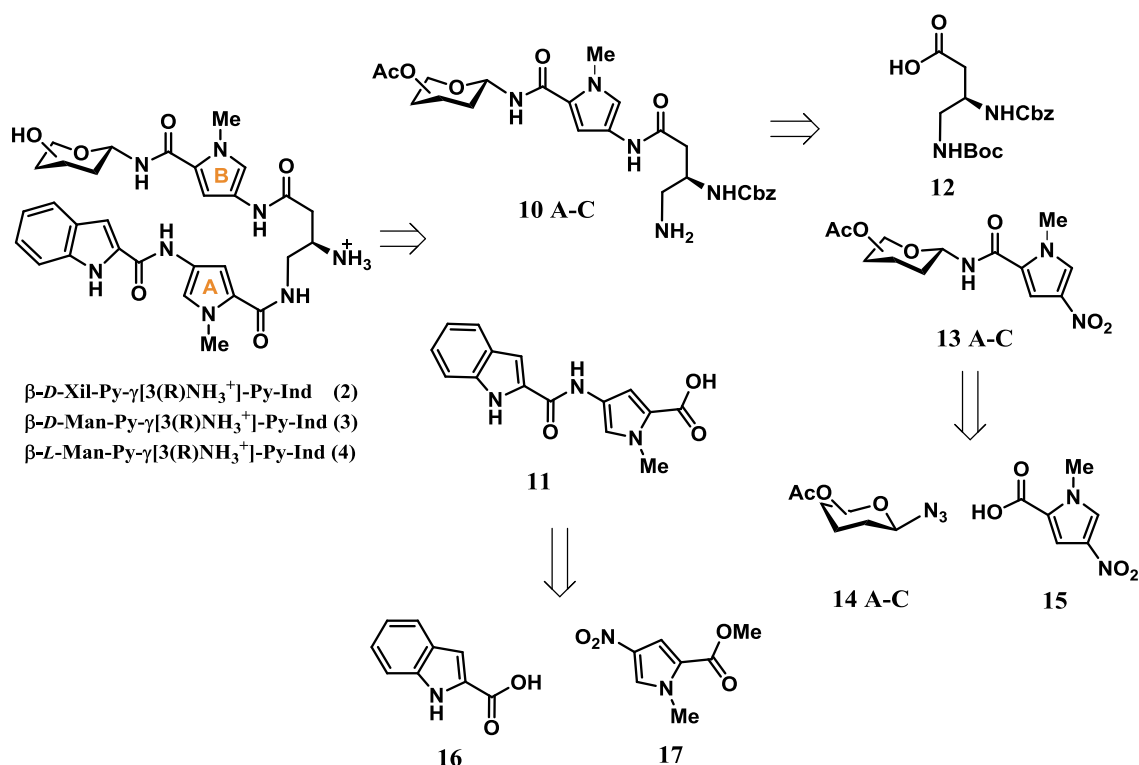


Esquema 2.2 Retrosíntesis del 3R-[(benciloxycarbonil) amino]4-[(tert-butóxicarbonil)amino]butirato de metilo

La etapa clave de esta síntesis es la homologación de Arndt-Eistert, con la consecuente activación del ácido **8**, seguido de la formación de la diazocetona correspondiente y por último la transposición de Wolff. Esta secuencia de tres etapas de reacción dificulta la síntesis, especialmente por la necesidad de generar diazometano para la formación de la diazocetona intermedia. Después de estudiar esta posible ruta sintética y analizar sus ventajas e inconvenientes, incluyendo los costes, se optó inicialmente por comprar el ácido comercial **12**, protegido ortogonalmente con dos carbamatos diferentes (Cbz en posición 3 y ter-butoxicarbonilo en posición 4).

La elección del grupo protector Cbz para el grupo amino en posición 3 del ácido 3,4-diaminobutírico, supuso un replanteamiento en la ruta lineal seguida hasta el momento para las glico-oligoamidas neutras. Con el fin de evitar desprotecciones prematuras de este grupo amino del fragmento γ , se decidió retomar la estrategia sintética convergente (Esquema 2.3). La etapa clave en la obtención de las glico-oligoamidas catiónicas sería el acoplamiento final que daría lugar al último enlace amida, entre el ácido de la hebra indol **11** y la amina **10**, que contiene ya la hebra carbohidrato unida al fragmento diaminobutírico. Estos dos fragmentos se prepararían por separado mediante reducciones para la obtención de los grupos amino, activaciones de los ácidos carboxílicos y acoplamientos consecutivos. Así, el fragmento γ sería incorporado a la hebra azúcar **13** mediante un acoplamiento entre el ácido comercial **12** y la amina derivada de la reducción del grupo nitro del compuesto **13**. A su vez las hebras azúcar **13A-C** se obtendrían mediante la formación del enlace amida anomérico, entre los correspondientes amino azúcares resultantes de la reducción del grupo azida y el ácido carboxílico **15** previamente sintetizado. Por otro lado, la hebra indol **11** sería el resultado de la formación del enlace amida entre el ácido indol-2-carboxílico comercial **16** y el nitropirrol **17**, seguido finalmente de una saponificación. Una de las ventajas que ofrecería esta estrategia sería la posibilidad de separar los anómeros α y β , desde el inicio de la síntesis, para lograr la obtención del anómero β deseado.

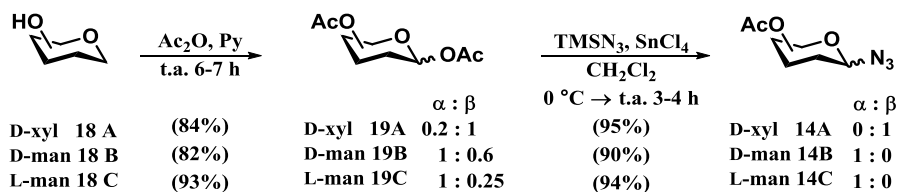
¹⁵ Shinagawa, S.; Kanamaru, T.; Harada, S.; Asai, M.; Okazaki, H. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 1458–1463.



Esquema 2.3 Análisis retrosintético de la síntesis de las glico-oligoamidas catiónicas

2.2.1 Síntesis de las glicosilaminas 20A-C

Para preparar las glicosilaminas se siguió una metodología empleada^{12b} anteriormente en nuestro grupo de investigación partiendo de los azúcares libres D-xilosa, D-manosa y L-manosa. Como se muestra en el Esquema 2.4, en primer lugar se llevó a cabo la protección de los hidroxilos con anhídrido acético en piridina a temperatura ambiente para dar los azúcares acetilados **19A-C**. A continuación, el tratamiento de los azúcares protegidos con trimetilsilil azida y tetracloruro de estaño condujo a las glicosil azidas deseadas **14A-C**.

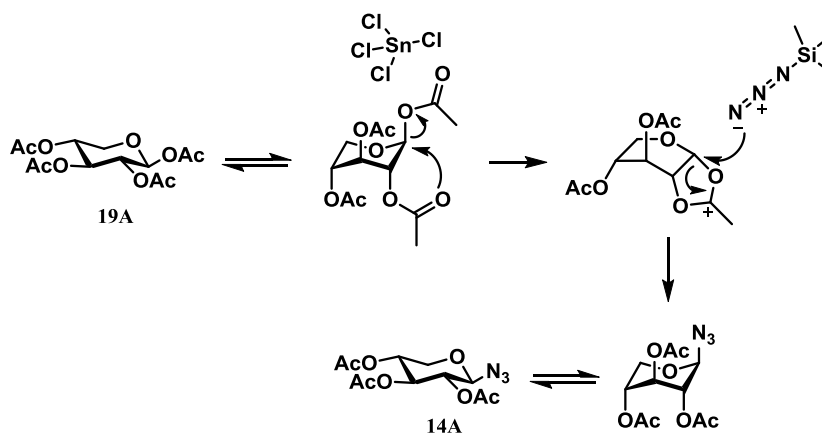


Esquema 2.4 Síntesis de las glicosilazidas 14A-C

La trimetilsilil azida es un dador de azida excelente y permite la conversión directa de monosacáridos acetilados a glicosil azidas, mediante catálisis con ácidos de Lewis. La estereoselectividad observada en estas reacciones, se debe a la formación del ion

^{12b} Badía, C.; Souard, F.; Vicent, C. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 10870–10881.

aciloxonio,¹⁶ obtenido por la asistencia anquimérica del grupo acetato vecino (Esquema 2.5). Posteriormente, el ion aciloxonio se abre por el ataque nucleofilo del dador de azida generando productos 1,2-*trans*. Cuando el carbohidrato acetilado de partida tiene una configuración 1,2-*cis*, este proceso es probablemente precedido por una anomerización promovida por el ácido de Lewis,¹⁷ como es el caso de la β -D-manosa, β -L-manosa y de la α -D-xilosa.



Esquema 2.5 Formación del ion aciloxonio en el caso de la β -D-xilosa

La configuración del protón anomérico y la conformación en disolución de las glicosil azidas **14A-C** fue determinada mediante RMN. En el caso de la D-xilopiranosil azida **14A** (Figura 2.4), tanto el desplazamiento químico (4.62 ppm) como la constante de acoplamiento H1/H2 ($J = 8.1$ Hz) han permitido asignar la configuración β al carbono anomérico. En cuanto a la conformación se refiere, la constante de acoplamiento H4/H5a tiene un valor de 9.7 Hz, correspondiente a un acoplamiento de dos protones en posición diaxial.¹⁸ Además, se detectan nOes entre H1/H3 y H1/H5 correspondientes a interacciones diaxiales, que indican una conformación 4C_1 en $CDCl_3$. Por el contrario, tanto en la azida de D-manosa **14B** como en la de L-manosa **14C**, se obtiene únicamente el anómero α . Esto se deduce del desplazamiento químico del protón anomérico (5.39 ppm) y del valor de la constante de acoplamiento entre H1/H2 ($J = 1.9$ Hz) que corresponde a una disposición diecuatorial. Sin embargo, la conformación de la silla para ambos compuestos difiere, siendo una conformación de tipo 4C_1 la encontrada en el caso de la azida de D-manosa y de 1C_4 la observada en la azida de L-manosa, como se puede deducir de los nOes.

¹⁶ (a) Paulsen, H. In *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*; Tipson, R. S., Derek, H., Eds.; Academic Press: 1971; Vol. Volume 26, p 127–195. (b) Györgydeák, Z.; Szilágyi, L.; Paulsen, H. *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, 12, 139–163. (c) Beckmann, H. S. G. and Wittmann, V. (2009) Azides in Carbohydrate Chemistry, in *Organic Azides: Syntheses and Applications* (eds S. Bräse and K. Banert), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. (d) Györgydeák, Z.; Thiem, J. In *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*; Derek, H., Ed.; Academic Press: 2006; Vol. Volume 60, p 103.

¹⁷ (a) Paulsen, H.; Györgydeák, Z.; Friedman, M. *Chem. Ber.* **1974**, 107, 1568–1578. (b) Farrell, M.; Zhou, J.; Murphy, P. V. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 14836–14851.

¹⁸ Paulsen, H.; Györgydeák, Z.; Friedmann, M. *Chem. Ber.* **1974**, 107, 1590–1613.

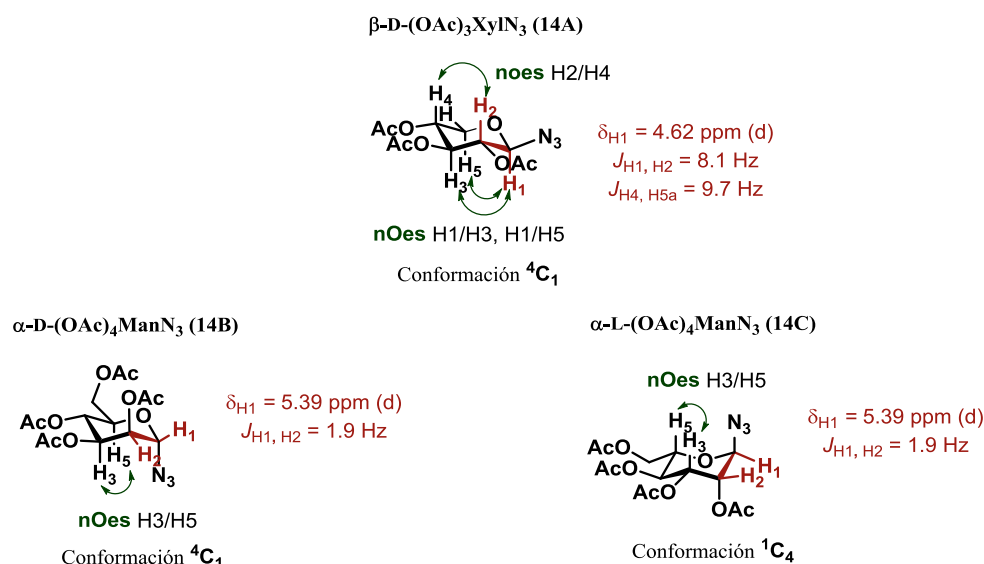
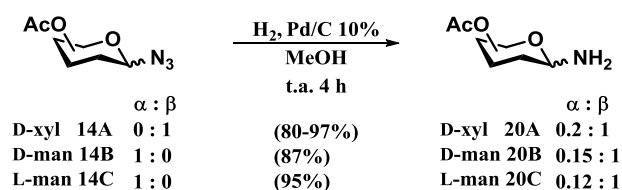


Figura 2.4 Estructuras de las glicosil azidas 14A-C con sus respectivos desplazamientos químicos, constantes de acoplamiento y noes detectados

La etapa final en la síntesis de las glicosilaminas **20A-C** es la reducción del grupo azida mediante una hidrogenación catalítica a presión atmosférica en metanol a temperatura ambiente usando Pd/C (10%) como catalizador (Esquema 2.6).



Esquema 2.6 Síntesis de las glicosilaminas 20A-C

A priori no es posible predecir el anómero que se obtiene de la reducción de las glicosil azidas. En la Figura 2.5 se muestran los datos de resonancia claves para la asignación tanto de la configuración como de la conformación de los compuestos mayoritarios obtenidos en cada caso. En el derivado de D-xilosa hay una preferencia por la formación del anómero β (proporción $\alpha:\beta = 0.2:1$), lo cual se confirmó mediante el valor de la constante de acoplamiento entre H1/H2 ($J = 8.9$ Hz), acorde con una disposición diaxial. Además los noes encontrados indican una conformación de tipo 4C_1 . Los derivados mayoritarios de D y L manosa presentan noes H1/H3 y H1/H5 que están en consonancia con una configuración β del carbono anomérico (proporción $\alpha:\beta = 0.15:1$), con una conformación 4C_1 para la D-manopiranosil amina **20B** y con una 1C_4 para el derivado **20C** de L-manosa. Por lo tanto, se deduce que la reducción de las α -azidas de manosa va acompañada de una anomerización. La preferencia del grupo amino anomérico por una orientación ecuatorial indicaría un efecto anomérico inverso.^{16b}

^{16b} Györgydeák, Z.; Szilágyi, L.; Paulsen, H. *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, 12, 139-163.

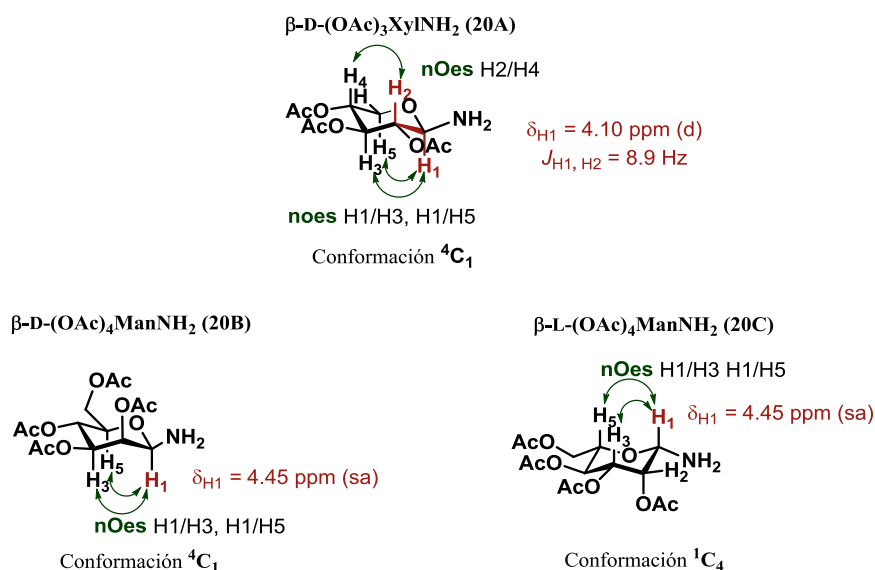
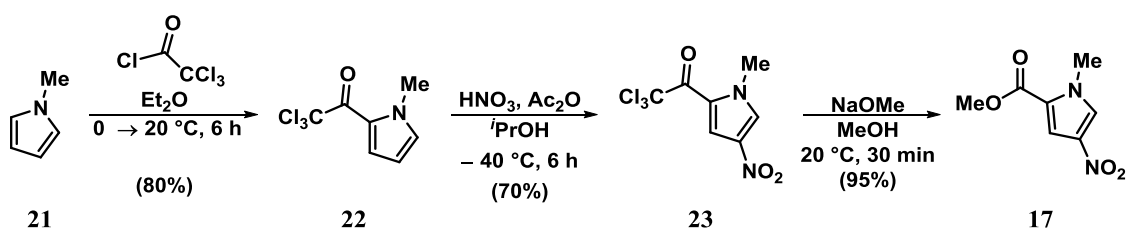


Figura 2.5 Estructuras de las glicosil aminas 20A-C con sus respectivos desplazamientos químicos, constantes de acoplamiento y noes observados.

2.2.2 Síntesis del pirrol de partida 17

En primer lugar se llevó a cabo la síntesis del pirrol **17**, empleado como producto de partida de las distintas hebras. El procedimiento seguido es una síntesis optimizada por el grupo de Dervan,^{10a} que permite obtener este pirrol en escala de gramos y sin tener que realizar ninguna columna cromatográfica en las purificaciones. Como se detalla en el Esquema 2.7, la síntesis comienza con la tricloroacetilación regioselectiva en posición dos del *N*-metilpirrol **21**, seguida de una nitración en posición cuatro para obtener el nitropirrol **23**, el cual, finalmente es tratado con metóxido sódico para dar el pirrol de partida **17** con un rendimiento global de las tres etapas del 53%.



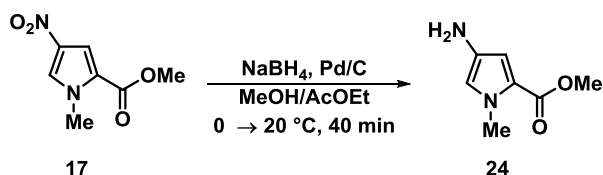
Esquema 2.7 Síntesis del de 1*N*-metil-4-nitro-1*H*-pirrol-2-carboxilato de metilo (**17**)

2.2.3 Síntesis de la hebra indol 11, Ind-Py-COOH

La síntesis de la hebra indol se compone de tres etapas de reacción, donde el paso clave es la formación del primer enlace amida de la molécula. La secuencia comienza

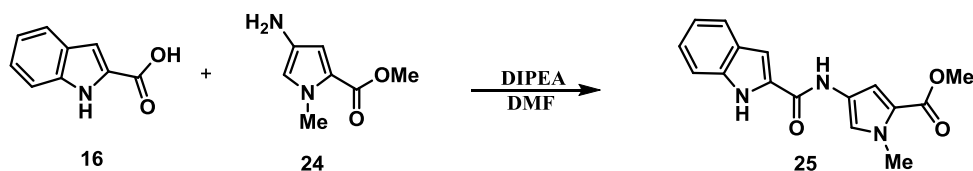
^{10a} Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6141–6146.

con la reducción del grupo nitro del pirrol **17** con borohidruro sódico¹⁹ usando como catalizador Pd/C (10%) en una mezcla de MeOH/ AcOEt a 0 °C para obtener de forma cuantitativa la amina **24** (Esquema 2.8). La ventaja de este método de reducción reside en la rapidez con la que transcurre la reacción, evitando la degradación de la amina en el medio de reacción. Debido a la inestabilidad de este tipo de aminas, la amina **24** fue empleada en la siguiente etapa sin purificación previa.



Esquema 2.8 Síntesis del 1*N*-metil-4-aminopirrol-2-carboxilato de metilo (**24**)

A continuación se llevó a cabo la formación del enlace amida entre el ácido indol-2-carboxílico (**16**) y la amina **24** (Esquema 2.9). La elección del agente de acoplamiento adecuado es un punto crítico a la hora de lograr buenos resultados. Hasta el momento en nuestro grupo de investigación este tipo de reacciones de formación de enlace amida se habían llevado a cabo usando como agente de acoplamiento *N,N'*-diisopropil carbodiimida (DIPC) y empleando como aditivo HOBt.^{12b} Sin embargo, durante los últimos años ha habido un gran desarrollo en cuanto a agentes de acoplamiento se refiere,⁵ lo cual supuso un aliciente para intentar optimizar tiempos de reacción y rendimientos.



Esquema 2.9 Formación del enlace amida entre el ácido indol-2-carboxílico y la amina **24**

En la Tabla 2.1. se muestran los resultados obtenidos en la síntesis del compuesto **25** empleando distintos agentes de acoplamiento.

¹⁹ Bando, T.; Narita, A.; Saito, I.; Sugiyama, H. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 4781–4790.

^{12b} Badía, C.; Souard, F.; Vicent, C. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 10870–10881.

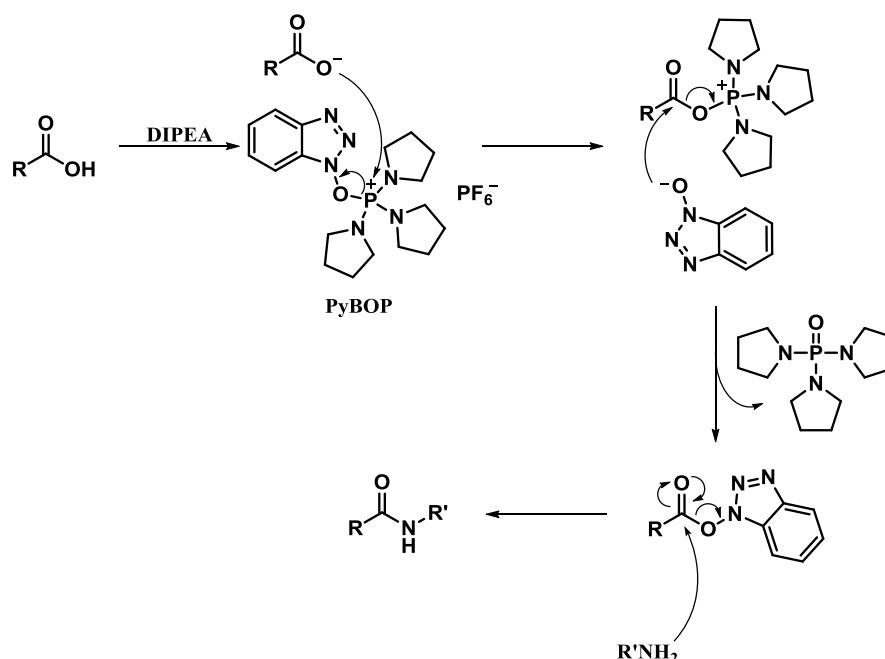
⁵ (a) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10827–10852. (b) Constable, D. J. C.; Dunn, P. J.; Hayler, J. D.; Humphrey, G. R.; Leazer, J. J. L.; Linderman, R. J.; Lorenz, K.; Manley, J.; Pearlman, B. A.; Wells, A.; Zaks, A.; Zhang, T. Y. *Green Chem.* **2007**, 9, 411–420. (c) Valeur, E.; Bradley, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 606–631. (d) El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2011**, 111, 6557–6602. (e) Pattabiraman, V. R.; Bode, J. W. *Nature* **2011**, 480, 471–479. (f) Lundberg, H.; Tinnis, F.; Selander, N.; Adolfsson, H. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 2714–2742.

Tabla 2.1 *Agentes de acoplamiento empleados en la formación del enlace amida*

Entrada	Agente de Acoplamiento	Tiempo (h) ^a	Rendimiento (%) ^b
1	HOBt/DIPC	24 (12+12)	79
2	PyBOP	13 (1+12)	90

^a Entre paréntesis aparecen los tiempos parciales de reacción, primero el de activación del ácido y luego el de acoplamiento con la amina. ^b Los rendimientos de reacción corresponden a los productos aislados y purificados.

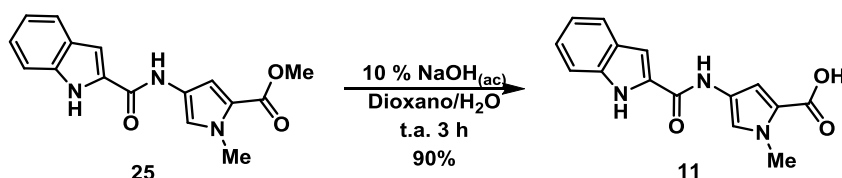
Como se puede observar, el tiempo de activación del ácido empleando DIPC/HOBt, fue de unas 12 horas y el rendimiento global de la reacción del 79%. Un problema añadido del uso de DIPC es que la urea formada como subproducto de la reacción es a veces difícil de eliminar. Por ello se decidió probar también con un agente de acoplamiento basado en HOBt que es una sal de fosfonio, PyBOP,²⁰ en presencia de la base de Hünig (DIPEA). Como se muestra en el Esquema 2.10, el ácido desprotonado reacciona con PyBOP para dar la especie activada, sal de aciloxifosfonio, y ⁻OBt. El ⁻OBt reacciona a continuación con el ácido activado y conduce a la formación del éster, que finalmente reacciona con la amina. La fuerza motriz de este proceso es la formación del óxido de fosfina correspondiente.


Esquema 2.10 *Mecanismo de activación del ácido empleando PyBOP y posterior acoplamiento*

Como se puede ver en la Tabla 2.1, empleando PyBOP el tiempo de activación del ácido queda reducido a una hora y el rendimiento mejora hasta alcanzar un 90% sin necesidad de realizar una purificación posterior.

El último paso en la síntesis del fragmento **11**, es la hidrólisis del éster **25** con una disolución acuosa de NaOH al 10%, cuya purificación se realizó por precipitación.

²⁰ Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 205–208.

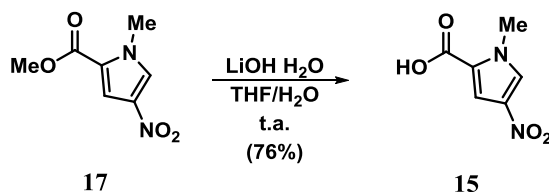


Esquema 2.11 Hidrólisis en medio básica para la obtención de la hebra indol 11

Gracias a la optimización de cada etapa, se ha logrado sintetizar la hebra indol con un buen rendimiento global (81%) en tres etapas, de una manera rápida, eficiente y evitando arduas purificaciones cromatográficas.

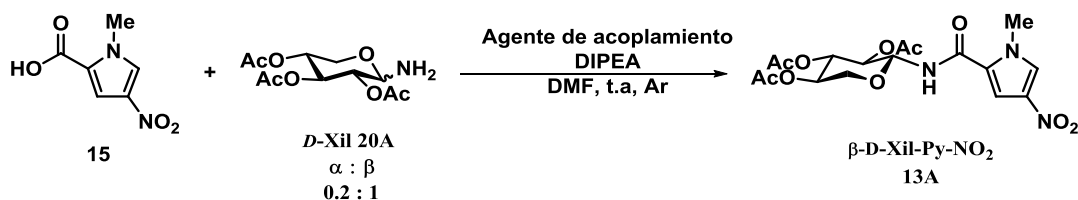
2.2.4 Síntesis de las hebras carbohidrato 27A-C, carbohidrato-Py-γ[3(R)NHCbz]-NHBoc

La síntesis de las hebras carbohidrato comienza con la hidrólisis del 1*N*-metil-4-nitropirrol-2-carboxilato de metilo **17**, con LiOH en una mezcla de THF/H₂O, obteniéndose el ácido **26** como un sólido blanco, con un rendimiento del 76%.



Esquema 2.12 Saponificación del éster 17

El paso siguiente de la síntesis es la formación del enlace amida entre el ácido **15** y las glicosil aminas **20A-C** (Esquema 2.12). Se debe tener en cuenta que la formación de este enlace puede ir acompañada de una anomerización de las glicosil aminas, dando lugar, tanto al derivado que contiene el anómero α como al que contiene el anómero β. A partir de este momento va a ser crucial el aislamiento exclusivamente del anómero β, que es el derivado que interesa para los posteriores estudios de interacción. La optimización de esta etapa se llevó a cabo con el derivado de xilosa, ya que fue este el primero que se sintetizó. Inicialmente se emplearon unas condiciones de reacción estándar empleando la base de Hünig y DMF como disolvente. De nuevo, se realizó una búsqueda del agente de acoplamiento más adecuado para lograr los mejores resultados, que se muestran en la Tabla 2.2.



Esquema 2.13 Síntesis del nitropirrol derivado de xilosa 13A

Tabla 2.2 Agentes de acoplamiento probados en la formación del enlace amidoglicosídico

Entrada	Agente de Acoplamiento	Tiempo ^a	Rendimiento (%) ^b
1	HOBt/DIPC	42 h (18+24)	53
2	PyBOP	12h 45' (45'+12)	65
3	HBTU	12h 30' (30'+12)	72-89

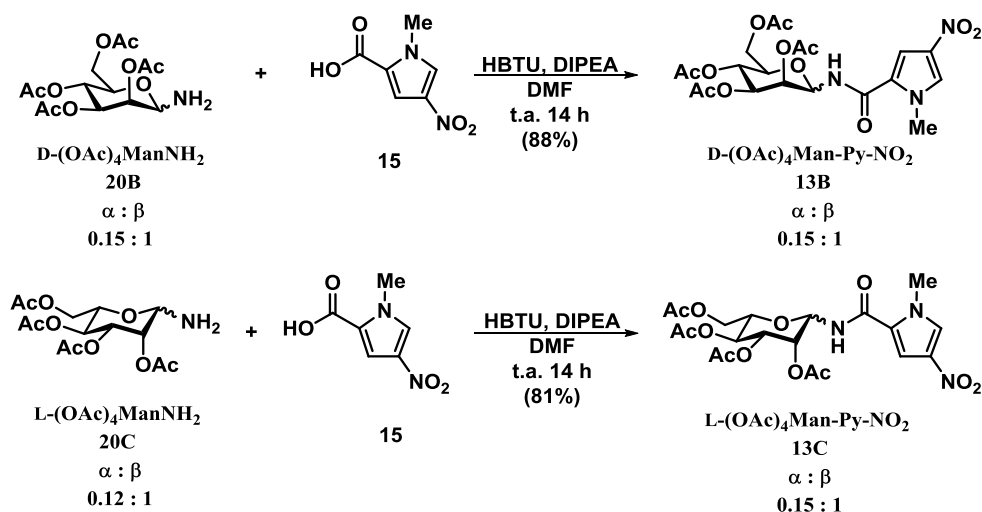
^a Tiempo total de reacción incluyendo las dos etapas, activación y acoplamiento. ^b Los rendimientos de reacción corresponden a los productos aislados y purificados.

En primer lugar la activación del ácido **15** se llevó a cabo con DIPC usando como aditivo HOBt, en presencia de DIPEA, durante 18 horas. A continuación se añadió la amina derivada de xilosa **20A** y se siguió por cromatografía en placa fina la desaparición de los productos de partida. Transcurridas 24 horas la amina se había consumido pero quedaba ácido activado. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía. A pesar de la formación de los dos anómeros (α y β), se logró aislar exclusivamente el anómero β deseado, con un 53% de rendimiento tras dos columnas cromatográficas. A la vista de las dificultades encontradas en la purificación y dados los buenos resultados obtenidos anteriormente empleando PyBOP se optó por su utilización. La activación del ácido transcurrió con mayor rapidez (entrada 2, Tabla 2.2) y se logró aislar el anómero β con un rendimiento del 65%, tras su separación por cromatografía en columna del otro anómero. Alentados por la mejora en el tiempo y el rendimiento se eligió intentar la formación del enlace amida con HBTU, reactivo derivado de una sal de uronio usado en la síntesis de glico-péptidos.²¹ El problema en el uso de este reactivo es la posible reacción secundaria que se puede dar entre la amina y el propio agente de acoplamiento, generando un derivado de guanidinio como subproducto.^{5c} Por ello el orden de adición y el tiempo de activación del ácido en esta reacción son cruciales. Se dejó activando el ácido con HBTU y DIPEA (entrada 3, Tabla 2.2) durante 30 minutos, a continuación se añadió la amina y se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. Durante la reacción apareció una pequeña cantidad de precipitado blanco que resultó ser el producto deseado. Se adicionó etanol frío y apareció más precipitado. Se filtró y se realizaron más precipitaciones sucesivas que dieron lugar a la obtención exclusivamente del anómero puro β (**13A**), a pesar de existir en la mezcla de reacción un porcentaje del anómero α . Este proceso se pudo reproducir a diferentes escalas logrando buenos rendimientos, entre el 72 y el 89%. De nuevo la configuración β del carbono anomérico se asignó en base a la constante de acoplamiento entre H1 y H2 ($J = 9.3$ Hz) obtenida del espectro de RMN. Además, las señales de cruce del espectro NOESY entre los protones H1/H3 y H1/H5a están de acuerdo con una conformación tipo 4C_1 para el anillo de piranosa.

Para la preparación de los glicosil-pirroles de D y L-manosa se emplearon las condiciones que mejores resultados dieron para xilosa (Esquema 2.14). Desafortunadamente, en ambas ocasiones no fue posible su precipitación por lo que fue necesaria su purificación mediante cromatografía, tras la cual solo se logró obtener una mezcla de anómeros $\alpha:\beta$ con una proporción 0.15:1. Para evitar la pérdida del

²¹ Davis, B. G. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 579–602.

producto deseado (anómero β) y siendo pequeña la proporción de anómero α , se decidió continuar la síntesis con la mezcla de anómeros.



A pesar de que no fue posible la separación de los dos anómeros, si fue posible su identificación y asignación por RMN. En ambos casos se confirmó la presencia del anómero minoritario α , gracias a la identificación del protón anomérico H1 a 5.76 ppm y a su constante de acoplamiento con H2 de 3.7 Hz. El anómero mayoritario β se caracterizó también gracias a la constante de acoplamiento entre H1/H2 de 1.4 Hz. Asimismo, la presencia de nOes entre H1/H3 y H1/H5 indica una conformación tipo 4C_1 en el caso del derivado de D-manosa **13B** y por el contrario, una conformación tipo 1C_4 para el derivado de L-manosa **13C**.

La siguiente etapa consistió en la reducción del grupo nitro del glicosil pirrol **13** para obtener la amina, que posteriormente se empleará para dar lugar al segundo enlace amida de la hebra carbohidrato. La reducción de los grupos nitro es una de las reducciones más versátiles de un grupo funcional en química orgánica, pudiendo dar lugar a una gran variedad de productos. En concreto, la reducción de un grupo nitro aromático puede dar lugar a derivados nitroso, oximas, hidroxilaminas, aminas, hidrazo derivados, lo cual puede suponer una desventaja a la hora de llevar a cabo reducciones.²² Al contrario que en la reducción del pirrol **17**, esta reducción entrañó algunos problemas. De nuevo, la optimización de la reacción se llevó a cabo con el derivado de xilosa. Como se muestra en la Tabla 2.3, se probaron diversas condiciones de reacción. En primer lugar se empleó el método empleado en la síntesis de las glico-oligoamidas neutras, NaBH_4 y Pd/C (10%) como catalizador (entrada 1). La reacción transcurre rápidamente, pero el medio básico generado conlleva la desprotección de los grupos acetato del carbohidrato. En primer lugar se observa la formación del

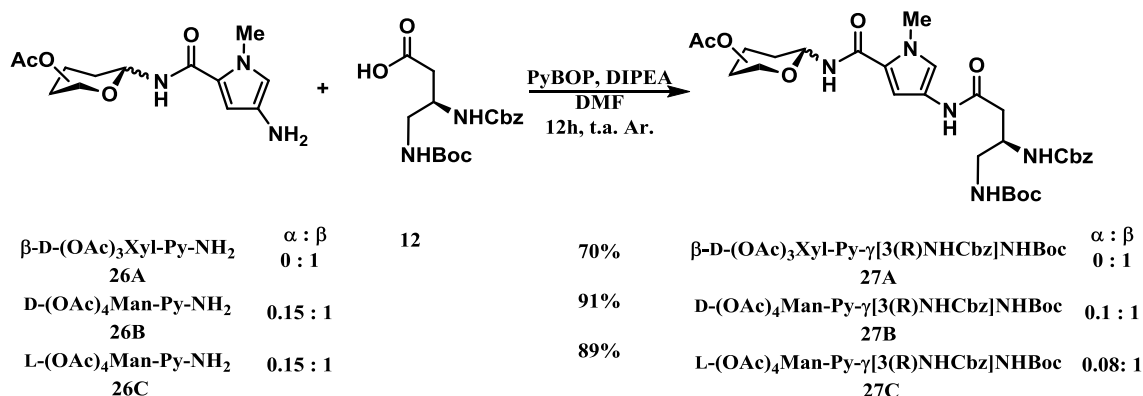
²² Blanco-Ania, D. Parallel synthesis of potential drugs based on the 2-aryethyl amine moiety. Tesis doctoral, Radboud Universiteit Nijmegen, Países Bajos, octubre 2009.

posible producto de reducción, pero casi al mismo tiempo se observa la aparición de otro producto con un R_F menor, atribuible al producto desprotegido. El espectro de resonancia del crudo muestra una mezcla de ambos productos, siendo mayoritario el que posee los hidroxilos libres. Al emplear el método convencional de hidrogenación catalítica con Pd/C (10%)²³ a presión atmosférica (entrada 2), no se obtuvieron mejores resultados. En esta ocasión, la evolución de la reacción fue bastante más lenta. Pasadas 8 horas, la cromatografía en capa fina mostraba gran cantidad de producto de partida y numerosas manchas, posiblemente correspondientes a diversos intermedios de reacción. La reacción se dejó durante 16 horas más sin que hubiera una evolución hacia el producto final deseado. Cuando se llevó a cabo esta misma reacción pero con una presión de hidrógeno de 45 p.s.i. (entrada 3), sí se observó la formación de la amina deseada **26A**. El espectro de RMN del crudo de reacción mostró la formación mayoritaria del producto deseado **26A**, aunque acompañada de una serie de impurezas que se podrían asociar a diversos productos de reducción o a la descomposición de la amina en el medio de reacción tras 18 horas de reacción. Por último, con objeto de intentar reducir el tiempo de reacción, para evitar productos de descomposición de la amina, se realizó la reducción empleando Pd(OH)₂ como catalizador (entrada 4). Desafortunadamente, la reducción del grupo nitro fue acompañada de la reducción del anillo pirrólico. Por lo tanto, finalmente las condiciones escogidas para realizar estas reducciones fueron las correspondientes a la entrada 3 (hidrogenación catalítica con Pd/C (10%) y 45 p.s.i.), intentando optimizar los tiempos de reacción para minimizar los productos de degradación de la amina pirrolica.

Debido a la inestabilidad y polaridad de estas aminas, su purificación mediante una columna cromatográfica supone una disminución del rendimiento considerable, por lo que se decidió continuar la síntesis sin purificación previa.

²³ Brown, T.; Taherbhai, Z.; Sexton, J.; Sutterfield, A.; Turlington, M.; Jones, J.; Stallings, L.; Stewart, M.; Buchmueller, K.; Mackay, H.; O'Hare, C.; Kluza, J.; Nguyen, B.; Wilson, D.; Lee, M.; Hartley, J. A. *Biorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 474–483.

moderados en el caso del derivado de xilosa **27A** y muy buenos para ambos derivados de manosa **27B** y **27C** (Esquema 2.16). El rendimiento de esta reacción depende en gran medida de lo bien que haya transcurrido la obtención de las aminas **26**, ya que se introducen en el acoplamiento si purificar. Por lo que el origen de las diferencias en los rendimientos del derivado de D-xilosa y los de D y L-manosa, se encuentra en el paso previo de reducción.



Esquema 2.16 Formación del enlace amida que incorpora el fragmento γ

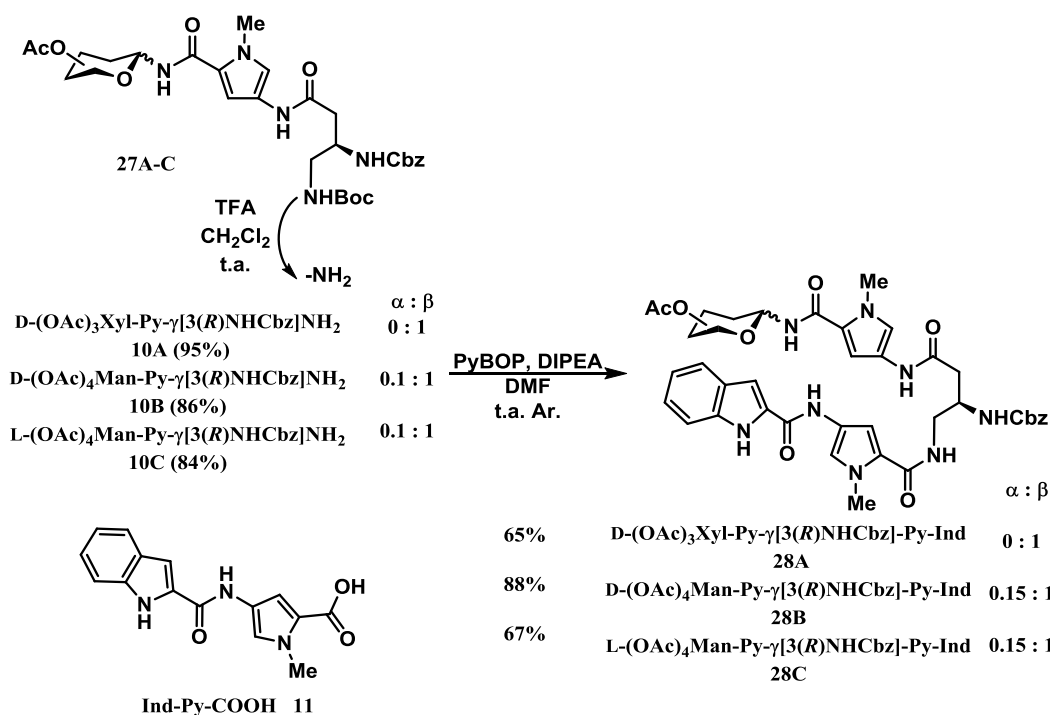
Gracias a la precipitación exclusivamente del anómero β del nitropirrol derivado de xilosa (**13A**), se ha podido obtener un solo isómero (anómero β) de la hebra carbohidrato de xilosa (**27A**). Sin embargo, para los derivados de D y L-manosa, hasta el momento, se tiene una mezcla de anómeros $\alpha:\beta$, aunque solamente con una pequeña proporción de anómero α ($\alpha:\beta = 0.1:1$), por lo que se continua la síntesis con la mezcla de ambos.

Dadas las complicaciones que entraña la síntesis de glico-derivados, y las arduas purificaciones que conllevan las reacciones de formación de enlace amida, en este punto, cabe destacar los buenos rendimientos globales obtenidos en la formación de las distintas hebras carbohidrato. Para la hebra de xilosa **27A**, el rendimiento oscila entre 38-47%, destacándose la obtención de un solo anómero. Para la hebra de D-manosa **27B**, el rendimiento es del 61% y para la de L-manosa **27C** del 55%.

2.2.5 Formación del enlace amida entre la hebra indol **11** y las hebras carbohidrato **28A-C** y reacciones de desprotección final

Una vez sintetizadas ambas mitades de la molécula, se debe llevar a cabo la formación del enlace amida final, entre la hebra indol (Ind-Py-COOH, **11**) y la hebra carbohidrato (carbohidrato-Py- γ [3(R)NHCbz]-NH₂, **10A-C**) para la obtención de la glico-oligoamidas catiónicas protegidas (Esquema 2.17). Para ello, en primer lugar se lleva a cabo la desprotección en medio ácido del grupo amino de las distintas hebras

carbohidrato protegidas con Boc.²⁴ La reacción transcurre limpiamente por lo que la amina es empleada sin necesidad de purificación. En el siguiente paso, se activa el ácido de la hebra indol **11** con PyBOP, usando como base DIPEA en DMF durante una hora, para después añadir la amina correspondiente. Las glico-oligoamidas catiónicas protegidas **28A-C** se obtienen con unos rendimientos comprendidos entre 65% y el 90%, después de su purificación mediante columna cromatográfica.



Esquema 2.17 Síntesis de las glico-oligoamidas catiónicas protegidas **29A-C**

Las últimas etapas de síntesis para obtener las glico-oligoamidas catiónicas son dos procesos de desprotección. La eliminación de los grupos acetato del carbohidrato correspondiente y la desprotección el grupo amino del fragmento γ . La desprotección de los grupos acetato se lleva a cabo en medio básico, el cual podría facilitar un proceso de epimerización en el grupo amino del fragmento γ en caso de no estar protegido, por lo que se deben desproteger en primer lugar. Por ello, cuando se planteó la síntesis, se buscó a su vez, proteger el grupo amino con un grupo, cuyas condiciones de desprotección fueran compatibles con la estabilidad del carbohidrato libre, y que no indujeran la anomerización de este. Por este motivo, se escogió el grupo protector Cbz, que se elimina mediante hidrogenación catalítica, sin necesidad de introducir un medio ácido. Estas reacciones en sí, no presentan dificultad, la complejidad reside en el proceso de aislamiento y purificación posterior.

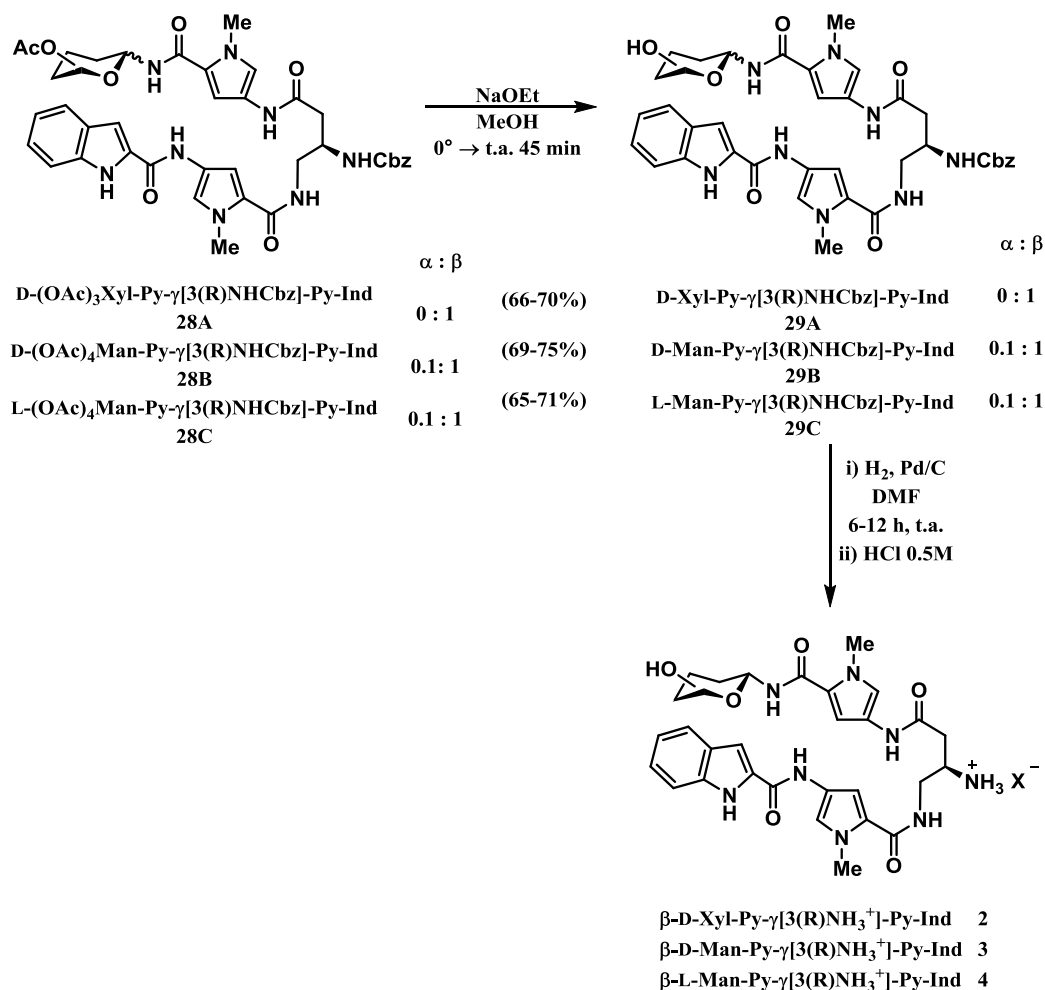
Como se observa en el Esquema 2.18, para realizar la desprotección de los hidroxilos del azúcar de los derivados **28A-C** se emplearon condiciones Zemplén.²⁵

²⁴ Abdelrahim, A. S.; Ziora, Z. M.; Bergeon, J. A.; Moss, A. R.; Toth, I. *Tetrahedron* **2009**, 65, 9436–9442.

²⁵ Reinhard, B.; Faillard, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 1994, 193–203.

Tras neutralizar la mezcla de reacción con resina de intercambio iónico ácida Amberlite IR 120, filtrar y evaporar el disolvente, se obtienen los compuestos **29A-C**. Para el derivado de xilosa **29A** no fue necesaria una purificación posterior. Sin embargo, en el caso de los derivados de manosa **29B** y **29C**, se intentó separar en este punto los dos anómeros (α y β), por lo que se realizó una purificación por cromatografía en columna empleando un cartucho de sílica de fase reversa C-18. No se logró la separación completa de los dos derivados y se obtuvo una mezcla de anómeros con una proporción de 0.1:1, α : β .

La última etapa de desprotección del carbamato se realiza mediante una hidrogenación catalítica con Pd/C (10%) a temperatura ambiente, a una presión de 40 p.s.i. Los tiempos de reacción varían entre 6 y 12 horas y los productos finales **2**, **3** y **4** se aislan del catalizador empleando un filtro de Nylon. En el caso de la glico-oligoamida catiónica de D-xilosa, no fue necesaria una purificación posterior, dada la limpieza con la que transcurre la reacción de desprotección. Además, se logra llegar al final de la síntesis con un único anómero β . El tratamiento de esta con una disolución acuosa de HCl e inmediata liofilización lleva a la obtención del clorohidrato de la amina con un rendimiento del 80%. La reacción de desprotección en el caso de las glico-oligoamidas catiónicas derivadas D y L-manosa, también transcurre limpiamente. Sin embargo, al no haber podido separar por completo los dos fue necesario realizar una purificación en fase reversa por HPLC semi-preparativo para lograr la separación total de los dos diastereómeros provenientes del anómero α y del β . Este proceso hace disminuir los rendimientos, los cuales oscilan entre el 59% y el 72%. Además, para estos dos derivados, el anión de la sal formada probablemente sea formiato, puesto que el aditivo empleado en la fase móvil del HPLC es ácido fórmico.



Esquema 2.18 Desprotecciones finales para la obtención de las glico-oligoamidas catiónicas 2-4

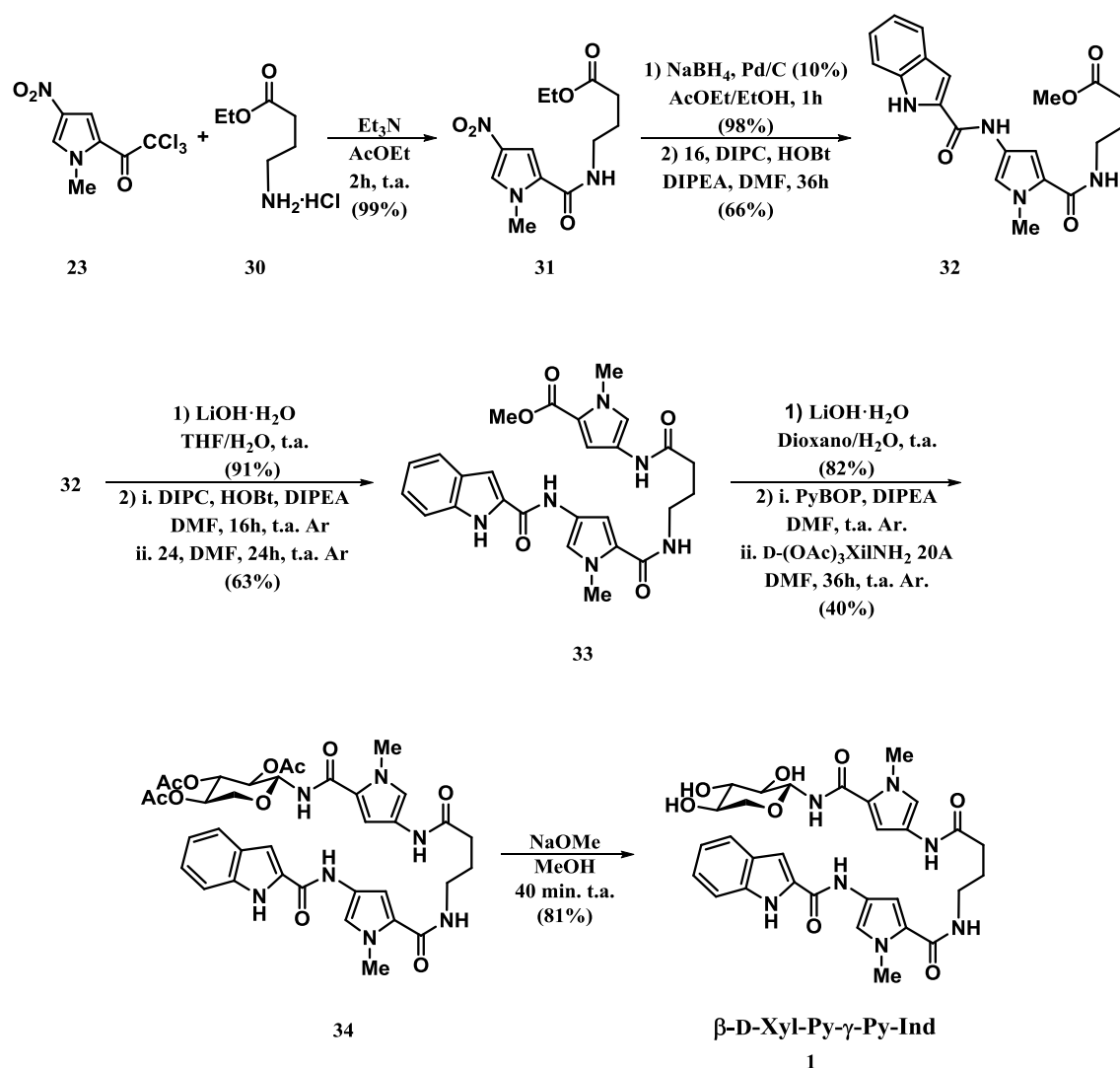
De este modo, se ha logrado llevar a cabo la síntesis de tres nuevas glico-oligoamidas catiónicas (**2**, **3** y **4**), obteniéndose exclusivamente el anómero de interés β , a través de una ruta convergente en disolución, lográndose rendimientos globales del 11%, 20% y 12% respectivamente. Cabe destacar, que en varias de las etapas, se ha podido evitar la purificación mediante columna cromatográfica, facilitando el proceso de aislamiento y purificación.

2.2.6 Síntesis de la glico-oligoamida neutra de xilosa

Como ya se anticipó en el apartado de objetivos de la introducción general de la tesis, por motivos comparativos se ha sintetizado la glico-oligoamida neutra de xilosa para poder establecer la comparación con su análogo catiónico. Su obtención se lleva a cabo empleando la metodología desarrollada anteriormente en nuestro grupo de investigación y ya publicada.^{12b}

^{12b} Badía, C.; Souard, F.; Vicent, C. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 10870–10881.

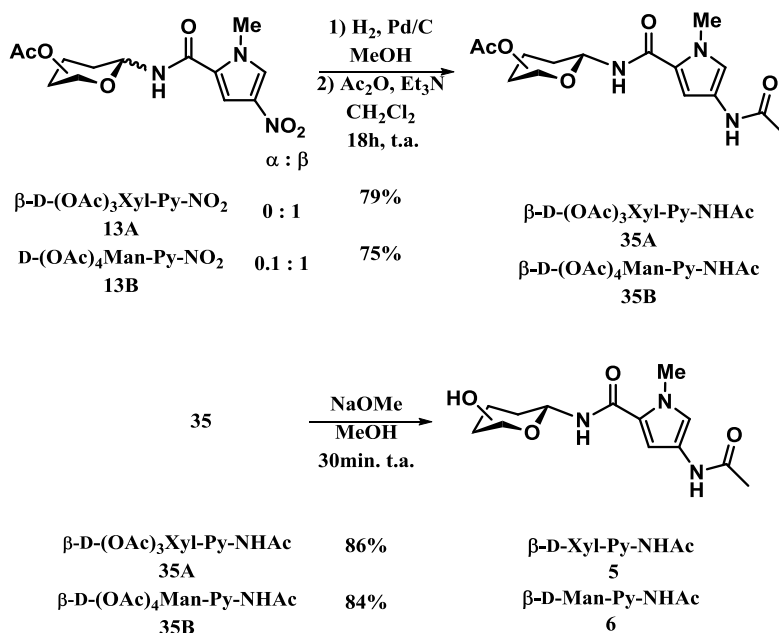
La síntesis (Esquema 2.19) comienza con la reacción del nitro pirrol **23** con clorhidrato de 4-aminobutirato de etilo **30** en AcOEt en presencia de trietilamina, conduciendo al éster **31** con un rendimiento cuantitativo. El éster EtO- γ -Py-Ind **32** se preparó mediante una secuencia de dos etapas sintéticas a partir del éster EtO- γ -Py-NO₂ **31**. En la primera etapa, se reduce el grupo nitro a amina mediante una hidrogenación catalítica empleando Pd/C (10%) como catalizador en presencia de NaBH₄ usando una mezcla de disolventes AcOEt/EtOH. Después de una hora de reacción, se filtra sobre tierras diatomeas y tras eliminación del disolvente, se obtiene la correspondiente amina, que se emplea sin posterior purificación. A continuación se activa *in situ* el ácido carboxílico 1-H-indol-2-carboxílico **16** en presencia de HOBt/DIPC como agentes activantes, en DMF. Finalmente se añade la amina EtO- γ -Py-NH₂ y se agita 24 h a temperatura ambiente, para obtener el éster **32** con un rendimiento del 66%. A continuación, se realiza una hidrólisis en medio básico con LiOH·H₂O en una mezcla THF/H₂O que da lugar al ácido HO- γ -Py-Ind con un rendimiento del 91 %. El siguiente paso es la introducción del segundo pirrol de la molécula generando el éster **33** formando el enlace amida entre el ácido y la amina **24** empleando de nuevo HOBt/DIPC. Posteriormente se realiza una hidrólisis del compuesto **33** para obtener el ácido precursor de la glico-oligoamida neutra con un 82% de rendimiento. La etapa clave en la síntesis es la introducción de la xilosa y formación del enlace amido-glicosídico. Este se genera usando PyBOP para activar del ácido en presencia de DIPEA y una vez activado se añade la glicosil amina de D-xilosa **20A** disuelta en DMF. La reacción se deja durante 36 horas a temperatura ambiente en atmosfera de argón. Durante la reacción hay anomerización, se purifica mediante cromatografía en columna y se logra aislar el anómero deseado β **34** (40%). Por último se eliminan los grupos acetato que protegen los hidroxilos con un tratamiento de MeONa en MeOH para obtener finalmente la glico-oligoamida neutra de xilosa **1** con un rendimiento en la desprotección del 81%.



Esquema 2.19 Síntesis de la glico-oligoamida neutra de D-xilosa 1

2.2.7 Síntesis de los modelos de la hebra carbohidrato $\beta\text{-D-Xil-Py-NAc}$ y $\beta\text{-D-Man-Py-NAc}$

Los estudios estructurales y de cooperatividad de enlace de hidrógeno hicieron necesaria la síntesis de los modelos de la hebra carbohidrato $\beta\text{-D-Xil-Py-NAc}$ (5) y $\beta\text{-D-Man-Py-NAc}$ (6).



Esquema 2.20 Síntesis de los modelos de D-xilosa 5 y D-manosa 6

Como se muestra en el Esquema 2.20, la síntesis de estos modelos implica dos etapas más a partir de los nitropirroles **13A** y **13B**. Se lleva a cabo la hidrogenación catalítica del grupo nitro en las condiciones descritas en el apartado 2.2.4, para obtener las aminas **26A** y **26B**. A continuación, se lleva a cabo una acetilación en anhídrido acético, trietilamina y CH₂Cl₂, obteniéndose el modelo protegido **35A** y **35B** con unos rendimientos del 79% y 75% respectivamente. En el caso del derivado de D-xilosa, se parte desde el anómero puro β desde el inicio, sin observarse anomerización a lo largo de la síntesis. En cambio, en el derivado de D-manosa, se parte de una mezcla de anómeros, que tras la reacción de acetilación es posible separar. Finalmente se realiza la desprotección de los hidroxilos en condiciones Zemplén y se logran aislar los modelos con unos rendimientos del 86% para el modelo de β -D-xilosa **5** y del 84% para el modelo de β -D-manosa **6**.

2.3 Conclusiones del capítulo

Se ha diseñado y optimizado una ruta sintética convergente en disolución para la obtención de las nuevas glico-oligoamidas catiónicas. Además, en varias etapas sintéticas, se ha logrado precipitar el producto deseado, evitando purificaciones cromatográficas que disminuyen el rendimiento. En particular, la síntesis de la hebra indol, se logra con un elevado rendimiento (81%) en escala multigramo, sin realizar una sola columna cromatográfica.

Se han logrado sintetizar tres nuevas glico-oligoamidas catiónicas, β -D-Xil-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**), β -D-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) y β -L-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**), conteniendo el deseado anómero β exclusivamente, mediante el empleo la ruta diseñada, con unos rendimientos globales de 11%, 20% y 12% respectivamente.

Además, el uso de esta vía de síntesis facilitó la obtención de los modelos de hebra carbohidrato de β -D-Xil-Py-NHAc (**5**) y β -D-Man-Py-NHAc (**6**) con unos rendimientos globales del 60% y 55%.

Por último, se ha logrado obtener la glico-oligoamida neutra de D-xilosa **1** mediante la ruta optimizada previamente en nuestro grupo de investigación.

2.4 Experimental section

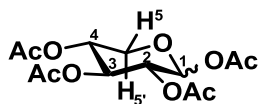
Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from commercial sources and used without further purification. Solvents were distilled according to the standard procedures. The 0.2 μm nylon filters were provided by Symta. Reactions were followed, and R_F values were obtained, using thin-layer chromatography (TLC) on silica gel-coated plates (Merk 60 F254) with the indicated solvent mixture. Detection was performed with UV light and/or by charring at ca. 150 °C after dipping into a solution of KMnO_4 or ninhydrin. Column chromatography was carried out using Merck silica gel (60 Å pore size, 40–63 μm). NMR spectra were recorded on a Varian Inova-300 (300 MHz), Varian Inova-400 (400 MHz), Mercury-400 (400 MHz), Varian Unity-500 (500 MHz), and Bruker AVANCE 500 MHz spectrometers in the solvent indicated. Chemical shifts are given in parts per million (ppm) with respect to trimethylsilane (0.00 ppm), or $\text{CD}_3\text{SOCHD}_2$ (2.50 ppm) as an internal standard for ^1H NMR; and CDCl_3 (77.16 ppm) or CD_3SOCD_3 (39.52 ppm) as an internal standard for ^{13}C NMR. Coupling constants are reported as J values in hertz (Hz). Multiplicities are reported as: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), dd (doublet of doublets), dt (doublet of triplets), ddd (double, double doublet) or m (multiplet). Broad peaks are indicated by br. Low resolution ESI mass spectra were recorded on an Agilent Technology HPLC-MS series 1100 mass spectrometer. High resolution mass spectra (HRMS) were recorded on an Agilent 6520-Accurate-Mass LC/MS Q-TOF mass spectrometer. IR experiments were recorded on a Perkin-Elmer Spectrum One FTIR spectrometer. Elemental analyses were carried out using a Carlo Erba Instruments CHNS-O EA1108 element analyser. Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 241MC polarimeter in a 1 dm cell. Semipreparative HPLC-MS was run with a SunFire Prep C18, (50 mm \times 4.6 mm \times 5 μm) column on a Waters separation module (Waters 2545/SFO/2767) coupled to a Waters 3100 mass detector using ESI+. The fractions were collected with a Waters 2767 sampler manager. The following HPLC conditions were used: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (98:2 \rightarrow 5:95) (HCO_2H , 0.1%), flow rate of 1 mL/min, UV detection using diode array (λ =190–400 nm).

General procedure for acetylation of free monosaccharides

Acetic anhydride (15 equiv.) was added dropwise to a stirred solution of the suitable monosaccharide (1 equiv.) in pyridine. The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 6-7 hours. The reaction mixture was quenched with water, the

layers were separated, and aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 \times). Subsequently, the combined organic layers were washed with 10% CuSO_4 aqueous solution, washed with brine, dried over NaSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*.

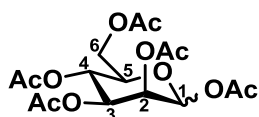
1,2,3,4-tetra-O-acetyl- α,β -D-xylopyranose (19A)



According to the general procedure, D-xylose (2.5 g, 7.85 mmol) afforded **19A** as an anomer α/β mixture, 0.2/1 (6.59 mmol, 84%).

A β anomer analytical sample was obtained after recrystallization from EtOH for characterization. **$^1\text{H-NMR}$** [300 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 2.05 (s, 6H, 2 COCH_3), 2.06 (s, 3H, COCH_3), 2.10 (s, 3H, COCH_3), 3.52 (dd, $J = 8.4, 12.0$ Hz, 1H, $\text{H}5'$), 4.14 (dd, $J = 4.8, 12.0$ Hz, 1H, $\text{H}5$), 4.95-4.99 (m, 1H, $\text{H}4$), 5.03 (dd, $J = 6.8, 8.4$ Hz, 1H, $\text{H}2$), 5.20 (dd, $J = 8.1, 8.4$ Hz, 1H, $\text{H}3$), 5.71 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, $\text{H}1$). **$^{13}\text{C-RMN}$** [75 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 20.6 (4 COCH_3), 62.8 (CH_25), 68.4 ($\text{CH}4$), 69.6 ($\text{CH}2$), 71.1 ($\text{CH}3$), 92.1 ($\text{CH}1$), 169.2 (2 COCH_3), 169.7 (2 COCH_3). **MS** [ESI, (m/z): 336 [$\text{M} + \text{NH}_4$] $^+$, 341 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 659 [$2\text{M} + \text{Na}$] $^+$]. **FTIR** [ν (cm^{-1}): 2967, 2888, 1745, 1380, 1221, 1083, 1041. **Elem. Anal.** calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_9$: C 49.06%, H 5.70%; found: C 48.77%, H 6.00%. R_F : 0.15 (hexane/ AcOEt , 3:1) **M.p.**: 124-126 $^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{25} = -27.2^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3).

1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- α,β -D-mannopyranose (19B)

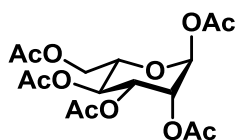


According to the general procedure, D-mannose (300 mg, 1.66 mmol) afforded **19B** as a colorless gum anomer α/β mixture (1.37 mmol, 82%).

$^1\text{H-NMR}$ [500 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 2.01 (6H, 2 $\times\text{COCH}_3$), 2.05 ($\text{H}6$, 2 $\times\text{COCH}_3$), 2.09 (6H, 2 $\times\text{COCH}_3$), 2.11 (3H, COCH_3), 2.17 (3H, COCH_3), 2.18 (3H, COCH_3), 2.22 (3H, COCH_3), 3.80 (ddd, $J = 10.0, 5.4, 2.4$ Hz, 1H, $\text{H}5\beta$), 4.01-4.07 (m, 1H, $\text{H}5\alpha$), 4.10 (dd, $J = 12.3, 2.3$ Hz, 1H, $\text{H}6\alpha$), 4.13 (dd, $J = 12.3, 2.4$ Hz, 1H, $\text{H}6\beta$), 4.28 (dd, $J = 12.3, 4.8$ Hz, 1H, $\text{H}6\alpha$), 4.31 (dd, $J = 12.3, 5.4$ Hz, 1H, $\text{H}6\beta$), 5.13 (dd, $J = 10.0, 3.2$ Hz, 1H, $\text{H}3\beta$), 5.26 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, $\text{H}2\alpha$), 5.29-5.37 (m, 3H, $\text{H}4\beta$, $\text{H}3\alpha$, $\text{H}4\alpha$), 5.49 (dd, $J = 3.2, 1.1$ Hz, 1H, $\text{H}2\beta$), 5.86 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H, $\text{H}1\beta$) 6.09 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, $\text{H}1\alpha$). **$^{13}\text{C-RMN}$** [125 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 20.5 (COCH_3), 20.7 (2 $\times\text{COCH}_3$), 20.8 (4 $\times\text{COCH}_3$), 20.9 (2 $\times\text{COCH}_3$), 21.0 (COCH_3), 62.1 ($\text{CH}_26\beta$), 62.2 ($\text{CH}_26\alpha$), 65.4 ($\text{CH}4\beta$), 65.6 ($\text{CH}4\alpha$), 68.2 ($\text{CH}2\beta$), 68.4 ($\text{CH}2\alpha$), 68.8 ($\text{CH}3\alpha$), 70.6 ($\text{CH}5\beta$), 70.7 ($\text{CH}5\alpha$), 73.2 ($\text{CH}3\beta$) 90.4 ($\text{CH}1\beta$), 90.7 ($\text{CH}1\alpha$), 168.2 (COCH_3), 168.4 (COCH_3), 169.6 (2 $\times\text{COCH}_3$), 169.8 (2 $\times\text{COCH}_3$), 170.1 (COCH_3), 170.2 (COCH_3), 170.6 (COCH_3),

170.7 (COCH₃). **HRMS** [EI, (m/z)]: calcd for C₁₆H₂₂O₁₁[M+Na]⁺ = 413.1060, found: 413.1063. **R_F**: 0.27 (Et₂O/pentane, 3:2)

1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- α,β -L-mannopyranose (**19C**)

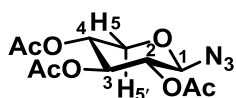


According to the general procedure, L-mannose (1.0 g, 5.55 mmol) afforded **19C** as a colorless gum anomer α/β mixture, 1/0.25 (5.14 mmol, 93%). A α anomer analytical sample was obtained after column chromatography (hexane/AcOEt, 1:1). **¹H-NMR** [500 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 2.00 (s, 3H, COCH₃), 2.04 (s, 3H, COCH₃), 2.08 (s, 3H, COCH₃), 2.16 (s, 3H, COCH₃), 2.17 (s, 3H, COCH₃), 4.02-4.06 (m, H5), 4.0 (dd, J = 12.4, 2.5 Hz, 1H, H6), 4.27 (dd, J = 12.4, 4.9 Hz, 1H, H6'), 5.25 (dd, J = 2.2, 2.2 Hz, 1H, H2), 5.33-5.37 (m, 2H, H3, H4), 6.09 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H1). **¹³C-NMR** [125 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 20.76 (COCH₃), 20.78 (COCH₃), 20.84 (COCH₃), 20.89 (COCH₃), 20.99 (COCH₃), 62.2 (CH6), 65.6 (CH4), 68.4 (CH2), 68.8 (CH3), 70.7 (CH5), 90.7 (CH1), 168.2 (COCH₃), 169.6 (COCH₃), 169.8 (COCH₃), 170.1 (COCH₃), 170.7 (COCH₃). **HRMS** [EI, (m/z)]: calcd for C₁₆H₂₂NO₁₁ [M+NH₄]⁺ = 408.1500, found 408.1499. **FTIR** [ν (cm⁻¹)]: 2962, 1752, 1370, 1220, 1149, 1088, 1053, 1026, 974, 755. **Elem. Anal.** calcd for C₁₆H₂₂NO₁₁: C 49.23%, H 5.68%; found: C 49.51%, H 5.84%. **R_F**: 0.27 (Et₂O/pentane, 3:2). [α]_D²⁵ = -54.3 (c = 2.6, CHCl₃).

General procedure for glycosyl azide synthesis

Stannic tetrachloride (0.86 eq) was added dropwise to a stirred solution of the corresponding pentaacetate carbohydrate (1 eq) and trimethylsilyl azide (1.2 eq) in dichloromethane at 0 °C. The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. After this time, the solution was quenched with water, washed with a solution of aqueous sodium hydrogen carbonate and the two layers were separated. Then, the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂, the combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated under reduce pressure. The residue afforded a syrup which crystalized on standing. This solid was recrystallized from isopropanol or ethanol to afford the pure material.

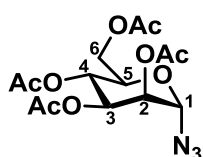
2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-xylopyranosyl azide. (AcO)₃- β -D-Xyl-N₃ (**14A**)



According to the general procedure, an anomer mixture of α and β -D-xylopyranose tetraacetate (2.00 g, 6.29 mmol), afforded azide **14A** ((AcO)₃- β -D-Xyl-N₃), as a white crystal after recrystallization (1.8 g, 95%). **¹H-**

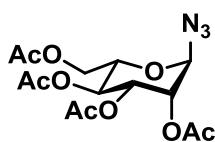
NMR [400 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 2.03 (s, 3 H, COCH_3), 2.04 (s, 3 H, COCH_3), 2.07 (s, 3 H, COCH_3), 3.43 (dd, $J = 11.7, 9.6$ Hz, 1 H, $\text{H5}'$), 4.21 (dd, $J = 11.7, 5.3$ Hz, 1 H, H5), 4.63 (d, $J = 8.1$, 1 H, H1), 4.87 (dd, $J = 8.9, 8.1$, 1 H, H2), 4.97 (ddd, $J = 9.6, 8.9, 5.3$, 1H, H4), 5.18 (dd, $J = 8.9, 8.9$, 1 H, H3). **^{13}C NMR** [100 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 20.7 (COCH_3), 20.8 (COCH_3), 20.8 (COCH_3), 64.4 (CH5), 68.5 (CH4), 70.5 (CH2), 71.6 (CH3), 88.4 (CH1), 169.4 (COCH_3), 169.9 (COCH_3), 170.1 (COCH_3). **MS** [ESI, (m/z)]: 319 [$\text{M} + \text{NH}_4$] $^+$, 324 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 625 [$2\text{M} + \text{Na}$] $^+$. **Elem. Anal.** calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_7$: C 43.86%, H 5.02%, N 13.95%; found C 43.80%, H 4.98%, N 13.89%. **R_F**: 0.23 (hexane/AcOEt, 3:1) $[\alpha]_{\text{D}}^{30} = -79.8$ ($c = 1$, CHCl_3).

2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl azide. (AcO) $_4$ - α -D-Man- N_3 (14B**)**



According to the general procedure, an anomer mixture of α and β -D-mannopyranose pentaacetate (516 mg, 1.32 mmol), afforded azide **14B** (AcO) $_4$ - α -D-Man- N_3), as a white powder after recrystallization from 2-propanol (444 mg, 1.19 mmol, 90%). **^1H -NMR** [500 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 1.99 (s, 3H, COCH_3), 2.05 (s, 3H, COCH_3), 2.11 (s, 3H, COCH_3), 2.16 (s, 3H, COCH_3), 4.10-4.20 (m, 2H, H5 and H6), 4.30 (dd, $J = 12.5, 5.7$ Hz, 1H, $\text{H6}'$), 5.15 (dd, $J = 3.0, 1.9$ Hz, 1H, H2), 5.23 - 5.31 (m, 2H, H3 , H4), 5.39 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H1). **^{13}C NMR** [125 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 20.8 (COCH_3), 20.8 (COCH_3), 20.9 (COCH_3), 21.0 (COCH_3), 62.3 ($\text{CH}_2\text{6}$), 65.8 (CH4), 68.4 (CH3), 69.3 (CH2), 70.8 (CH5), 87.6 (CH1), 169.8 (COCH_3), 169.9 (COCH_3), 170.0 (COCH_3), 170.7 (COCH_3). **HRMS** [EI, (m/z)]: calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_9$ [$\text{M} + \text{NH}_4$] $^+ = 391.1460$, found: 391.1462. **FTIR** [ν (cm^{-1})]: 3438, 3390, 2960, 2464, 2125, 1748, 1434, 1371, 1223, 1125, 1085, 1053, 960. **Elem. Anal.** calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_9$: C 45.04%, H 5.13%, N 11.26%; found C 45.41%, H 5.26%, N 11.12%. **R_F** = 0.43 (toluene/AcOEt, 4:1). **M.p.**: 52-54 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 118$ ($c = 1.5$, CHCl_3).

2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -L-mannopyranosyl azide. (AcO) $_4$ - α -L-Man- N_3 (14C**)**



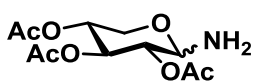
According to the general procedure, an anomer mixture of α and β -L-mannopyranose pentaacetate (1.95 g, 5.0 mmol), afforded azide **14C** (AcO) $_4$ - α -L-Man- N_3), as a white crystal after recrystallization from 2-propanol (4.75 mmol, 1.77 g, 94%). **^1H -NMR** [500 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 1.99 (s, 3H, COCH_3), 2.05 (s, 3H, COCH_3), 2.11 (s, 3H, COCH_3), 2.16 (s, 3H, COCH_3), 4.10-4.18 (m, 2H, H5 , H6), 4.30 (dd, $J = 12.5, 5.8$ Hz, 1H, $\text{H6}'$), 5.14 (dd, $J = 2.9, 1.9$ Hz, 1H, H2), 5.20 - 5.29 (m, 2H, H3 , H4), 5.38 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H1). **^{13}C NMR** [125 MHz, δ (ppm), CDCl_3]: 20.8 (COCH_3), 20.8 (COCH_3), 20.9 (COCH_3), 21.0 (COCH_3),

62.3 (CH₂6), 65.8 (CH4), 68.4 (CH3), 69.3 (CH2), 70.8 (CH5), 87.6 (CH1), 169.8 (COCH₃), 169.9 (COCH₃), 170.0 (COCH₃), 170.7 (COCH₃). **HRMS** [EI, (m/z)]: calcd for C₁₄H₂₃N₄O₉ [M+NH₄]⁺ = 391.1460, found: 391.1457. **FTIR** [ν (cm⁻¹)]: 3637, 3438, 3390, 2960, 2464, 2122, 1748, 1434, 1371, 1223, 1125, 1085, 1053, 960. **Elem. Anal.** calcd for C₁₄H₁₉ N₃O₉: C 45.04%, H 5.13%, N 11.26%; found C 45.14%, H 5.30%, N 11.17%. **R_F** = 0.43 (toluene/AcOEt, 4:1). **[α]_D²⁵** = -120.9 (*c* = 3.9, CHCl₃).

General procedure for glycosyl azides reduction

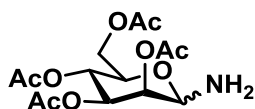
Pd/C (10% wt) was added to a solution of glycosyl azide in MeOH. The mixture was stirred for 4-5 h, at room temperature under hydrogen atmosphere (1 atm). The catalyst was separated by filtration with nylon filter. The methanolic solution was concentrated on a rotary evaporator.

2,3,4-tri-O-acetyl- α,β -D-xylopyranosyl amine. (AcO)₃- α,β -D-Xyl-NH₂ (20A)



According to the general procedure, azide **14A** (1.1 g, 4.0 mmol) afforded an anomer mixture (α/β , 0.2:1) as a white solid (952 mg, 3.4 mmol, 86%). A β anomer analytical sample was obtained after column chromatography (hexane/AcOEt, 3:2) for characterization. **¹H-NMR** [400 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 2.00 (s, 3H, CH₃CO), 2.01 (s, 3H, CH₃CO), 2.05 (s, 3H, CH₃CO), 3.30 (dd, *J* = 11.5 Hz, 10.5, CH5', 1H), 4.04 (dd, *J* = 11.5, 5.7, Hz, 1H, CH5), 4.10 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, CH1), 4.77 (dd, *J* = 9.5, 9.5 Hz, 1H, CH2), 4.96 (ddd, *J* = 10.5, 9.5, 5.7 Hz, 1H, CH4), 5.23 (dd, *J* = 9.5, 9.5 Hz, 1H, CH3). **¹³C NMR** [100 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 21.1 (2×COCH₃), 21.2 (COCH₃), 63.8 (CH₂5), 69.5 (CH4), 72.3 (CH2), 72.7 (CH3), 85.4 (CH1), 169.9 (COCH₃), 169.9 (COCH₃), 170.3 (COCH₃). **MS** [EI, (m/z)]: 276 [M + H]⁺, 298 [M + Na]⁺. **Elem. Anal.** calcd for C₁₁H₁₇ NO₇: C 47.97%, H 6.23%, N 5.17%; found C 48.51%, H 6.31%, N 5.09%. **R_F** = 0.34 (hexane/AcOEt, 3:2). **M.p.**: 101-102 °C. **[α]_D²⁵** = -22.4 (*c* = 1.1, CHCl₃).

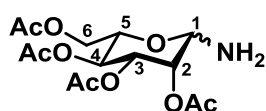
2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α,β -D-mannopyranosyl amine. (AcO)₄- α,β -D-Man-NH₂ (20B)



According to the general procedure, azide **14B** (775 mg, 2.08 mmol) afforded an anomer mixture (α/β , 0.15:1) as a white solid (614 mg, 1.77 mmol, 87%). A β anomer analytical sample was obtained after column chromatography (hexane/AcOEt, 1:2) for characterization. **¹H-NMR** [400 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 1.98 (s, 3H, CH₃CO), 2.04 (s, 3H, CH₃CO), 2.10 (s,

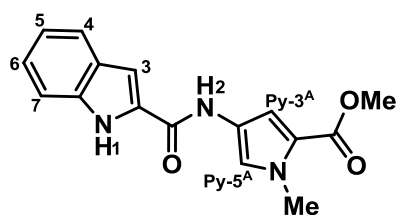
3H, CH₃CO), 2.20 (s, 3H, CH₃CO), 3.66 (ddd, *J* = 10.0, 5.6, 2.4 Hz, CH₅, 1H), 4.11 (dd, *J* = 12.3, 2.4 Hz, CH₆, 1H), 4.25 (dd, *J* = 12.3, 5.6 Hz, CH_{6'}, 1H), 4.45 (br, 1H, CH₁), 5.06 (dd, *J* = 10.0, 3.4 Hz, CH₃, 1H), 5.19 (dd, *J* = 10.0, 10.0 Hz, CH₄, 1H), 5.40 (dd, *J* = 3.4, 1.2 Hz, CH₂, 1H). ¹³C NMR [100 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 20.7 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 21.1 (COCH₃), 62.9 (CH₄), 63.0 (CH₂6), 66.0 (CH₂), 70.8 (CH₃), 72.2 (CH₅), 73.5 (CH₁), 169.9 (COCH₃), 170.2 (COCH₃), 170.4 (COCH₃), 170.9 (COCH₃). **MS** [EI, (*m/z*): 348 [M + H]⁺, 370 [M + Na]⁺. **HRMS** [EI, (*m/z*): calcd for C₁₄H₂₁NO₉ [M+NH₄]⁺ = 347.1216, found: 347.1210. **FTIR** [ν (cm⁻¹): 3412, 2927, 1748, 1636, 1432, 1368, 1280, 1219, 1120, 1063, 1041, 961. **R_F** = 0.12 (hexane/AcOEt, 1:2). **M.p.**: 150-154 °C [α]_D²⁵ = -11.6 (*c* = 5, CHCl₃).

2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α,β-L-mannopyranosyl amine. (AcO)4-α,β-L-Man-NH₂ (20C)



According to the general procedure, azide **14C** (1.67 g, 4.47 mmol) afforded an anomer mixture (α/β, 0.12:1) as a white solid (1.47 mg, 4.23 mmol, 95%). A β anomer analytical sample was obtained after column chromatography (hexane/AcOEt, 1:2) for characterization. **¹H-NMR** [400 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 1.98 (s, 3H, CH₃CO), 2.04 (s, 3H, CH₃CO), 2.10 (s, 3H, CH₃CO), 2.20 (s, 3H, CH₃CO), 3.66 (ddd, *J* = 10.0, 5.6, 2.4 Hz, CH₅, 1H), 4.11 (dd, *J* = 12.3, 2.4 Hz, CH₆, 1H), 4.25 (dd, *J* = 12.3, 5.6 Hz, CH_{6'}, 1H), 4.45 (br, 1H, CH₁), 5.06 (dd, *J* = 10.0, 3.4 Hz, CH₃, 1H), 5.19 (dd, *J* = 10.0, 10.0 Hz, CH₄, 1H), 5.40 (dd, *J* = 3.4, 1.2 Hz, CH₂, 1H). ¹³C NMR [100 MHz, δ (ppm), CDCl₃]: 20.7 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 21.1 (COCH₃), 62.9 (CH₄), 63.0 (CH₂6), 66.0 (CH₂), 70.8 (CH₃), 72.2 (CH₅), 73.5 (CH₁), 169.9 (COCH₃), 170.2 (COCH₃), 170.4 (COCH₃), 170.9 (COCH₃). **MS** [EI, (*m/z*): 348 [M + H]⁺, 370 [M + Na]⁺. **HRMS** [EI, (*m/z*): calcd for C₁₄H₂₁NO₉ [M+NH₄]⁺ = 347.1216, found: 347.1210. **FTIR** [ν (cm⁻¹): 3412, 2927, 1748, 1636, 1432, 1368, 1280, 1219, 1120, 1063, 1041, 961. **R_F** = 0.12 (hexane/AcOEt, 1:2). **M.p.**: 149-155 °C [α]_D²⁵ = 8.3 (*c* = 4.1, CHCl₃).

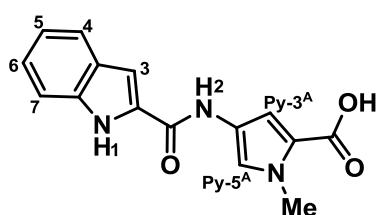
MeO-Py-Ind (25)



A mixture of NaBH₄ (92 mg, 2.44 mmol) in water (2 mL) was added dropwise to a solution of MeO-Py-NO₂ (**17**) (150 mg, 0.82 mmol) and Pd/C (10%) (30 mg) in AcOEt/MeOH (3:3) at 0 °C. The reaction mixture

was allowed to warm up to room temperature and stirred for 30 min. The catalyst was then removed by vacuum filtration through Celite and the solvent was evaporated to afford amine (**24**) which was used without further purification. A solution of 2-indole carboxylic acid (**16**) (120 mg, 0.75 mmol), PyBOP (429 mg, 0.83 mmol) and DIPEA (261 μ L, 1.5 mmol) in CH_2Cl_2 (2 mL) was stirred at rt for 30 min. Next, a solution of amine (**24**) in CH_2Cl_2 (2 mL) was added to the previous activated acid and was stirred overnight at rt. Reaction mixture was quenched with HCl (1 M) and the aqueous layer extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , then filtered and the solvent evaporated *in vacuo*. A white solid was obtained in a 90% yield. **$^1\text{H-NMR}$** [400 MHz, δ (ppm), CD_3SOCD_3]: 3.76 (s, 3 H, COCH_3), 3.88 (s, 3 H, NCH_3), 6.97 (d, $J = 1.9$, 1H, CH Py-3^A), 7.05 (ddd, $J = 8.0$, 7.0, 1.0, 1H, CH Ind-6), 7.20 (ddd, $J = 8.0$, 7.0, 1.0, 1H, CH Ind-5), 7.27 (dd, $J = 2.2$, 1.0, 1H, CH Ind-3), 7.46 (dd, $J = 8.0$, 1.0, 1H, CH Ind-7), 7.51 (d, $J = 1.9$, 1H, CH Py-5^A), 7.65 (d, $J = 8.0$, 1H, CH Ind-4), 10.35 (s, 1 H, NH_2), 11.68 (s, 1 H, NH_1). **$^{13}\text{C NMR}$** [100 MHz, δ (ppm), CD_3SOCD_3]: 36.3(NCH_3), 51.1(COCH_3), 102.9 (CH Ind-3), 108.4 (CH Py-3^A), 112.4 (CH Ind-4), 118.9 (C Py), 119.9(CH Ind-6), 120.9 (CH Py-5^A), 121.6 (CH Ind-7), 122.6(C Ind), 123.5(CH Ind-5), 127.1(C Py), 131.5(C Ind), 136.7(C Ind), 158.3 (CONH), 160.8 (COCH_3). **MS** [ESI, (m/z)]: 296.0 $[\text{M-H}]^-$. **HRMS** [ESI, (m/z)]: calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}_3$ $[\text{M+H}]^+ = 297.1113$, found: 297.1118. **Elem. Anal.** calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}_3$: C 64.64%, H 5.09%, N 14.13%; found: C 64.51%, H 5.02%, N 14.22%. **FTIR** [ν (cm^{-1})]: 3359, 3271, 1681, 1644, 1566, 1451, 1250. $R_F = 0.57$ (Hexane/EtOAc, 1:1).

HO-Py-Ind (11)



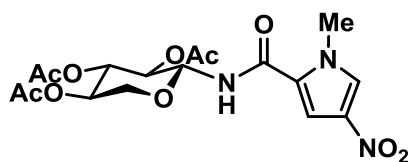
An aqueous solution of NaOH 1N (13 mL) was added to a stirred solution of MeO-Py-Ind (**25**) (200 mg, 0.67 mmol) in dioxane (13 mL). The reaction mixture was stirred at rt for 3 h. The solution was then cooled to 0 °C and pH was adjusted to 4-5 with an aqueous solution of HCl 1 M. The precipitate was filtered yielding a white powder (170 mg, 90% yield) and dried *in vacuo*. **$^1\text{H-NMR}$** [400 MHz, δ (ppm), CD_3SOCD_3]: 3.86 (s, 3 H, NCH_3), 6.91 (d, $J = 1.9$, 1H, CH Py-3^A), 7.05 (dd, $J = 7.5$, 7.5, 1H, CH Ind-6), 7.19 (dd, $J = 7.7$, 7.7, 1H, CH Ind-5), 7.26 (d, $J = 1.9$, 1H, CH Ind-3), 7.43 –

7.48 (m, 2H, CH Ind-7, CH Py-5^A), 7.65 (d, $J = 7.7$, 1H, CH Ind-4), 10.33 (s, 1H, NH₂), 11.67 (d, $J = 2.3$, 1H, NH₁), 12.26 (s, 1H, OH). ¹³C NMR [100 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 36.3 (NCH₃), 102.8 (CH Ind-3), 108.3 (CH Py-3^A), 112.3 (CH Ind-4), 119.8 (CH Ind-6), 120.3 (CH Py-5^A), 121.6 (CH Ind-7), 122.2 (C Py), 123.4 (CH Ind-5), 127.1 (C Ind), 131.5 (C Ind), 136.6 (C Ind), 158.2 (CONH), 162.0 (COCH₃). MS [ESI, (m/z)]: 284.0 [M + H]⁺, 306.0 [M + Na]⁺. HRMS [ESI, (m/z)]: calcd for C₁₅H₁₃O₃N₃ [M+H]⁺ = 283.0957, found: 283.0966. Elem. Anal. calcd for C₁₅H₁₃O₃N₃: C 63.60%, H 4.63%, N 14.83%; found: C 63.31%, H 4.80%, N 14.62%. FTIR [ν (cm⁻¹)]: 3437, 1653, 1558, 1457, 748. $R_F = 0.19$ (DCM/MeOH, 9:1)

General procedure for Sugar-Py-NO₂ (13 A-C)

To a solution of HO-Py-NO₂ (**17**) (1 equiv) and HBTU (1.2 equiv.) in DMF under argon atmosphere, DIPEA (2 equiv.) was added dropwise at rt. The reaction mixture was stirred for 30 min. Next, a solution of the suitable glycosylamine (**20 A-C**) (1.1 equiv.) in DMF was added dropwise to the stirred mixture. After 16 h, the DMF was evaporated and a different purification procedure was followed for each compound.

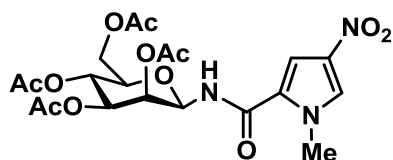
(AcO)₃- β -Xyl-Py-NO₂ (**20 A**)



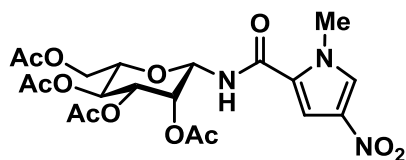
According to the general procedure, HO-Py-NO₂ **17** (565 mg, 3.32 mmol) and 2,3,4-tri-O-acetyl- β -D-xylopyranosylamine (1.00 g, 3.65 mmol) afforded pure β anomer (AcO)₃- β -Xyl-Py-NO₂, as white needles (1.01 g, 2.39 mmol, 72%) after recrystallization from pure ethanol. ¹H-NMR [400 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 1.93 (s, 3H, COCH₃), 1.98 (s, 3H, COCH₃), 2.00 (s, 3H, COCH₃), 3.61 (dd, $J = 10.9, 10.9$ Hz, 1H, CH5'), 3.89 (s, 3H, NCH₃), 3.91 (dd, $J = 10.9, 5.5$ Hz, 1H, CH5), 4.82 (ddd, $J = 10.9, 9.6, 5.5$ Hz, 1H, CH4), 5.01 (dd, $J = 9.3, 9.3$ Hz, 1H, CH2), 5.31 (dd, $J = 9.6, 9.3$ Hz, 1H, CH3), 5.35 (dd, $J = 9.2, 9.2$ Hz, 1H, CH1), 7.49 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, CH Py-3^B), 8.19 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, CH Py-5^B), 9.07 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, NH5). ¹³C NMR [100 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 20.4 (COCH₃), 20.5 (COCH₃), 20.5 (COCH₃), 37.5 (NCH₃), 63.3 (CH5), 68.6 (CH4), 70.6 (CH2), 72.7 (CH3), 77.7 (CH1), 108.8 (CH Py-3^B), 125.1 (C Py), 128.8 (CH Py-5^B), 133.8 (Py CNO₂), 160.0 (CONH), 169.2 (COCH₃), 169.7 (COCH₃), 170.1 (COCH₃). MS [ESI, (m/z)]: 450.0 [M + Na]⁺, 428.0 [M + H]⁺. HRMS

[ESI, (m/z)]: calcd for $C_{17}H_{21}O_{10}N_3$ $[M+H]^+ = 427.1223$, found 427.1227. **Elem. Anal.** calcd for $C_{17}H_{21}O_{10}N_3$: C 47.78%, H 4.95%, N 9.83%; found: C 48.00%, H 5.02%, N 10.08%. **FTIR** [ν (cm^{-1})]: 3375, 1739, 1531, 1313, 1224, 1067, 1036. $R_F = 0.39$ ($CH_2Cl_2/EtOAc$, 8:2). $[\alpha]_D^{25} = -53.9$ ($c = 1$ in chloroform).

(AcO)₄- α/β -D-Man-Py-NO₂ (20 B)



According to the general procedure, HO-Py-NO₂ **17** (301 mg, 1.77 mmol) and 2,3,4,5-tetra-*O*-acetyl- β -D-manopyranosylamine (674 mg, 1.94 mmol) afforded an anomer mixture α/β (0.15:1) (AcO)₄-D-Man-Py-NO₂, as white solid (778 mg, 1.55 mmol, 88%) after purification by column chromatography hexane/AcOEt (2:1). **¹H-NMR** [300 MHz, δ (ppm), CD_3SOCD_3]: 1.93 (s, 3H, COCH₃, β), 1.97 (s, 3H, COCH₃, α), 2.00 (s, 3H, COCH₃, α), 2.01 (s, 3H, COCH₃, β), 2.03 (s, 3H, COCH₃, β), 2.04 (s, 3H, COCH₃, α), 2.13 (s, 3H, COCH₃, α), 2.19 (s, 3H, COCH₃, β), 3.89 (s, 3H, NCH₃, β), 3.90 (s, 3H, NCH₃, α), 3.96 – 4.04 (m, 3H, CH₆ β , CH₅ α , CH₆ α), 4.08 (ddd, $J = 9.8, 5.1, 2.7$ Hz, 1H, CH₅ β), 4.19 (dd, $J = 12.2, 5.1$ Hz, 1H, CH_{6'} β), 5.09 (dd, $J = 9.8, 9.8$ Hz, 1H, CH₄ β), 5.13-5.15 (m, 1H, CH₄ α , CH₂ α), 5.27 (dd, $J = 3.5, 1.3$ Hz, 1H, CH₂ β), 5.38 (dd, $J = 9.8, 3.5$ Hz, 1H, CH₃ β), 5.69 (dd, $J = 9.3, 2.4$ Hz, 1H, CH₁ α), 5.76 (dd, $J = 9.2, 3.7$ Hz, 1H, CH₃ α), 5.85 (dd, $J = 8.4, 1.4$ Hz, 1H, CH₁ β), 7.63 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, CH Py-3^B β), 7.76 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, CH Py-3^B α), 8.18 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, CH Py-5^B β), 8.23 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, CH Py-5^B α), 9.00 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH₅ β), 9.20 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, NH₅ α). **¹³C NMR** [75 MHz, δ (ppm), CD_3SOCD_3]: (β anomer) 20.8 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 21.5 (COCH₃), 39.0 (NCH₃), 63.0 (CH₂6), 65.7 (CH₄), 69.6 (CH₂), 71.2 (CH₃), 74.2 (CH₅), 77.2 (CH₁), 109.8 (CH, Py-3^B), 125.3 (C Py), 129.1 (CH, Py-5^B), 134.1 (Py CNO₂), 159.3 (CONH), 170.0 (COCH₃), 170.0 (COCH₃), 170.5 (COCH₃), 170.8 (COCH₃). (α anomer) 20.9 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 21.1 (COCH₃), 21.2 (COCH₃), 37.9 (NCH₃), 62.7 (CH₂6), 65.8 (CH₄), 68.6 (CH₃), 69.8 (CH₂), 72.8 (CH₅), 75.7 (CH₁), 109.9 (CH Py-3^B), 128.8 (CH Py-5^B), 159.8 (CONH), 169.6 (COCH₃), 169.7 (COCH₃), 169.9 (COCH₃), 170.3 (COCH₃). **MS** [ESI, (m/z)]: 500 $[M+H]^+$, 522 $[M+Na]^+$, 1021 $[2M+H]^+$. **HRMS** [ESI, (m/z)]: calcd for $C_{20}H_{25}O_{12}N_3$ $[M+H]^+ = 499.1438$, found 499.1434. **FTIR** [ν (cm^{-1})]: 3383, 1750, 1676, 1521, 1369, 1243, 1055. $R_F = 0.57$ (Hexano/EtOAc, 1:1).

(AcO)₄- α/β -L-Man-Py-NO₂ (20 C)

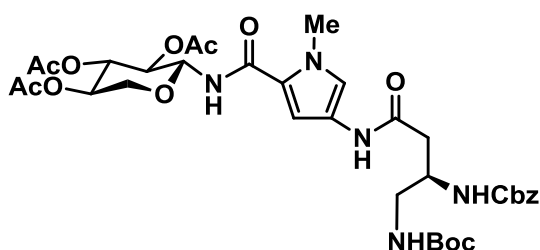
According to the general procedure, HO-Py-NO₂ **17** (691 mg, 4.06 mmol) and 2,3,4,5-tetra-*O*-acetyl- β -L-manopyranosylamine (1.55 g, 4.47 mmol) afforded an anomer mixture α/β (0.15:1) (AcO)₄-L-Man-Py-NO₂, as white solid (1.64 g, 3.29 mmol, 81%) after purification by column chromatography hexane/AcOEt (4:1). **¹H-NMR** [500 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 1.93 (s, 3H, COCH₃, β), 1.97 (s, 3H, COCH₃, α), 2.00 (s, 3H, COCH₃, α), 2.01 (s, 3H, COCH₃, β), 2.03 (s, 3H, COCH₃, β), 2.04 (s, 3H, COCH₃, α), 2.13 (s, 3H, COCH₃, α), 2.19 (s, 3H, COCH₃, β), 3.89 (s, 3H, NCH₃, β), 3.90 (s, 3H, NCH₃, α), 3.96 – 4.04 (m, 3H, CH₆ β , CH₅ α , CH₆ α), 4.08 (ddd, J = 9.8, 5.1, 2.7 Hz, 1H, CH₅ β), 4.19 (dd, J = 12.2, 5.1 Hz, 1H, CH_{6'} β), 5.09 (dd, J = 9.8, 9.8 Hz, 1H, CH₄ β), 5.13-5.15 (m, 1H, CH₄ α , CH₂ α), 5.27 (dd, J = 3.5, 1.3 Hz, 1H, CH₂ β), 5.38 (dd, J = 9.8, 3.5 Hz, 1H, CH₃ β), 5.69 (dd, J = 9.3, 2.4 Hz, 1H, CH₁ α), 5.76 (dd, J = 9.2, 3.7 Hz, 1H, CH₃ α), 5.85 (dd, J = 8.4, 1.4 Hz, 1H, CH₁ β), 7.63 (d, J = 2.0 Hz, 1H, CH Py-3^B β), 7.76 (d, J = 2.0 Hz, 1H, CH Py-3^B α), 8.18 (d, J = 2.0 Hz, 1H, CH Py-5^B β), 8.23 (d, J = 2.0 Hz, 1H, CH Py-5^B α), 9.00 (d, J = 8.4 Hz, 1H, NH₅ β), 9.20 (d, J = 9.2 Hz, 1H, NH₅ α). **¹³C NMR** [75 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: (β anomer) 20.8 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 21.5 (COCH₃), 39.0 (NCH₃), 63.0 (CH₂6), 65.7 (CH₄), 69.6 (CH₂), 71.2 (CH₃), 74.2 (CH₅), 77.2 (CH₁), 109.8 (CH, Py-3^B), 125.3 (C Py), 129.1 (CH, Py-5^B), 134.1 (Py CNO₂), 159.3 (CONH), 170.0 (COCH₃), 170.0 (COCH₃), 170.5 (COCH₃), 170.8 (COCH₃). (α anomer) 20.9 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 21.1 (COCH₃), 21.2 (COCH₃), 37.9 (NCH₃), 62.7 (CH₂6), 65.8 (CH₄), 68.6 (CH₃), 69.8 (CH₂), 72.8 (CH₅), 75.7 (CH₁), 109.9 (CH Py-3^B), 128.8 (CH Py-5^B), 159.8 (CONH), 169.6 (COCH₃), 169.7 (COCH₃), 169.9 (COCH₃), 170.3 (COCH₃). **MS** [ESI, (m/z)]: 500 [M+H]⁺, 522 [M+Na]⁺, 1021 [2M+H]⁺. **HRMS** [ESI, (m/z)]: calcd for C₂₀H₂₅O₁₂N₃ [M+H]⁺ = 499.1438, found 499.1441. **FTIR** [ν (cm⁻¹)]: 3435, 2963, 1750, 1673, 1521, 1422, 1369, 1312, 1243, 1226, 1105, 1055, 911, 853, 813, 751, 691, 598. R_F = 0.57 (Hexano/EtOAc, 1:1).

General procedure for Sugar-Py- γ [3(R)NHCBz]NHBoc (27 A-C)

A suspension of Pd/C 10% wt (20 mol%) in MeOH was added to a stirred solution of the suitable Sugar-Py-NO₂ (**13A-C**) (1 equiv.) in a solvent mixture MeOH/CH₂Cl₂ 1:1

under hydrogen atmosphere (1 atm). The mixture was stirred at room temperature for the time indicated in each case. The catalyst was removed by filtration with a Nylon filter, and the solvent was evaporated under reduced pressure to afford the resulting amine Sugar-Py-NH₂ (**26A-C**). The amines were used without further purification in the next step. In the meantime, a solution of (*R*)-3,4-Cbz-Dbu(Boc)-OH (**12**) (1 equiv.) and PyBOP (1.1 equiv.) and DIPEA (2 equiv.) in DMF was stirred at room temperature for 40 min. This solution was then added to appropriate amine (**27A-C**) and stirred overnight at room temperature. Evaporation of the solvent and purification by column chromatography afforded the title compounds.

β -D-(OAc)₃-Xyl-Py- γ [3(*R*)NHCbz]NHBoc (27 A**)**

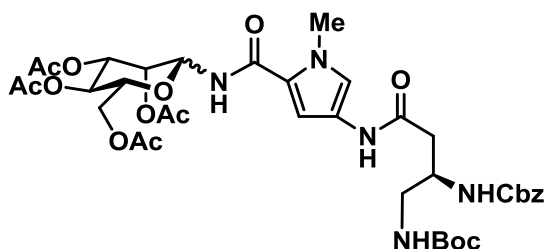


According to the general procedure, catalytic hydrogenation of (AcO)₃-Xyl-Py-NO₂ (**13A**) (375.0 mg, 0.90 mmol) in MeOH/CH₂Cl₂ (5:5 mL) shaken under hydrogen atmosphere (45 psi) over 18 h afforded amine (AcO)₃-Xyl-Py-NH₂ (**26A**)

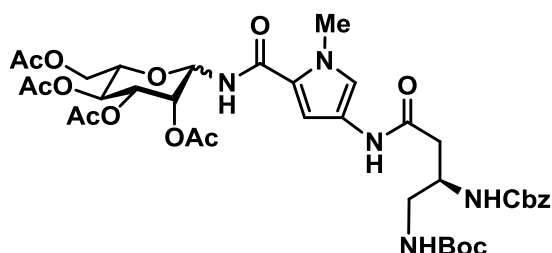
which was used without further purification. Coupling of amine **26A** with (*R*)-3,4-Cbz-Dbu(Boc)-OH (**12**) (275.0 mg, 0.78 mmol) yielded β -D-(OAc)₃-Xyl-Py- γ [3(*R*)NHCbz]NHBoc (**27 A**) as yellowish solid (392 mg, 70%), after purification by column chromatography (Hexane/EtOAc, gradient 1:2 to 1:10). ¹H-NMR [400 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 1.36 (s, 9H, NHCOOC(CH₃)₃), 1.90 (s, 3H, COCH₃), 1.97 (s, 3H, COCH₃), 2.00 (s, 3H, COCH₃), 2.35 - 2.41 (m, 2H, CH₂ γ c), 3.03 (t, *J* = 5.9, 2H, CH₂ γ a), 3.56 (dd, *J* = 10.9, 10.9, 1H, CH5'), 3.77 (s, 3H, NCH₃), 3.90 (dd, *J* = 10.9, 5.6, 1H, CH5), 3.93 - 3.97 (m, 1H, CH γ b), 4.80 (ddd, *J* = 10.1, 10.1, 5.5, 1H, CH4), 4.98 (d, *J* = 3.3, 2H, NHCOOCH₂Ph), 5.06 (dd, *J* = 9.3, 9.3 1 H, CH2), 5.30 (dd, *J* = 9.3, 9.3 1 H, CH3), 5.33 (dd, *J* = 9.3, 9.3, 1 H, CH1), 6.73 (d, *J* = 1.6, 1 H, CH Py-3^B), 6.81 (t, *J* = 5.9, 1H, NH COOC(CH₃)₃), 7.06 (d, *J* = 8.4, 1 H, NHCOOCH₂Ph), 7.19 (d, *J* = 1.6, 1H, CH Py-5^B), 7.29 - 7.36 (m, 5 H, NHCOOCH₂Ph), 8.60 (d, *J* = 9.4, 1 H, NH5), 9.82 (s, 1H, NH4). ¹³C NMR [100 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 20.4 (COCH₃), 20.5 (COCH₃), 20.5 (COCH₃), 28.2 (NHCOOC(CH₃)₃), 36.1 (NCH₃), 38.3 (CH₂ γ a), 43.4 (CH₂ γ c), 48.7 (CH γ b), 63.3 (CH5), 65.1 (NHCOOCH₂Ph), 68.7 (CH4), 70.6 (CH2), 72.8 (CH3), 77.7 (CH1), 77.8 (NHCOOC(CH₃)₃), 104.8 (CH Py-3^B), 119.0 (CH Py-5^B), 121.6 (C Py), 122.1 (C Py), 127.6 (NHCOOCH₂Ph), 127.7 (NHCOOCH₂Ph), 128.3 (NHCOOCH₂Ph), 137.1

(NHCOOCH₂Ph), 155.5 (NHCOOCH₂Ph), 155.8 (NHCOOC(CH₃)₃), 161.0 (CONH₄), 167.0 (CONH₅), 169.1 (COCH₃), 169.6 (COCH₃), 169.7 (COCH₃). **MS** [ESI, (m/z)]: 754.3 [M + Na]⁺, 732.3 [M + H]⁺. **HRMS** [ESI, (m/z)]: calcd for C₃₄H₄₅O₁₃N₅ [M+H]⁺ = 731.3034, found 731.3034. **FTIR** [ν (cm⁻¹)]: 3418, 1754, 1714, 1521, 1231, 852. **R_F** = 0.37 (Hexane/AcOEt, 1:3). $[\alpha]_D^{25} = -7.2$ (c = 0.95 in DMSO).

α/β -D-(OAc)₄-Man-Py- γ [3(R)NHCbz]NHBoc (27 B)



According to the general procedure, reaction of D-(AcO)₄-Man-Py-NO₂ (**13B**) (275.0 mg, 0.55 mmol) in MeOH/CH₂Cl₂ over 4 h afforded amine D-(AcO)₄-Man-Py-NH₂ (**26B**) which was used without further purification. Coupling of amine (**26B**) with (R)-3,4-Cbz-Dbu(Boc)-OH (**12**) (194 mg, 0.55 mmol) yielded an anomer mixture (α/β , 0.1:1) α/β -D-(OAc)₄-Man-Py- γ [3(R)NHCbz]NHBoc (**27 B**) as yellowish solid (423 mg, 0.53 mmol, 95%), after purification by column chromatography (Toluene/EtOAc, gradient 2:1 to 1:2). Only ¹H-NMR and ¹³C-NMR signals of β anomer were assigned. **¹H-NMR** [400 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 1.36 (s, 9H, NHCOOC(CH₃)₃), 1.92 (s, 3H, COCH₃), 2.01 (s, 3H, COCH₃), 2.03 (s, 3H, COCH₃), 2.17 (s, 3H, COCH₃), 2.38 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂ γ c), 3.03 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂ γ a), 3.77 (s, 3H, NCH₃), 3.88 – 3.95 (m, 1H, CH γ b), 3.99 (dd, *J* = 12.2, 2.2 Hz, 1H, CH₆), 4.04 (ddd, *J* = 9.9, 5.0, 2.2 Hz, 1H, CH₅), 4.18 (dd, *J* = 12.2, 5.0 Hz, 1H, CH₆), 4.98 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H, NHCOOCH₂Ph), 5.07 (dd, *J* = 10.0, 10.0 Hz, 1H, CH₄), 5.23 (dd, *J* = 3.5, 1.4 Hz, 1H, CH₂), 5.36 (dd, *J* = 10.0, 3.5 Hz, 1H, CH₃), 5.82 (dd, *J* = 8.8, 1.4 Hz, 1H, CH₁), 6.76 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, CH Py-3^B), 6.80 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, NHCOOC(CH₃)₃), 7.06 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NHCOOCH₂Ph), 7.25 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, CH Py-5^B), 7.31 (s, 5H, NHCOOCH₂Ph), 8.58 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, NH₅), 9.80 (s, 1H, NH₄). **¹³C NMR** [100 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: **MS** [ESI, (m/z)]: 826.4 [M + Na]⁺, 804.3 [M + H]⁺. **HRMS** [ESI, (m/z)]: calcd for C₃₇H₄₉O₁₅N₅ [M+H]⁺ = 803.3225, found 803.3256. **R_F** = 0.23 (Toluene/AcOEt, 2:1).

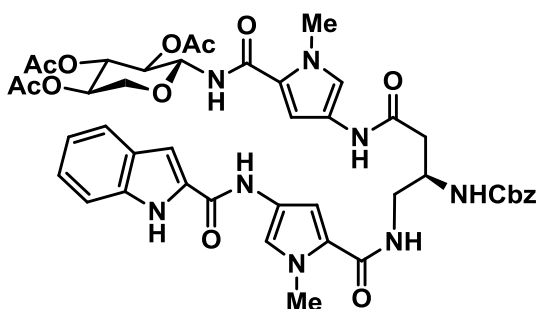
α/β -L-(OAc)₄-Man-Py- γ [3(R)NHCbz]NHBoc (27 C)

According to the general procedure, reaction of L-(AcO)₄-Man-Py-NO₂ (**13C**) (400.0 mg, 0.80 mmol) in MeOH/CH₂Cl₂ over 4 h afforded amine L-(AcO)₄-Man-Py-NH₂ (**26C**) which was used without further purification. Coupling of amine (**26C**) with (R)-3,4-Cbz-Dbu(Boc)-OH (**12**) (281 mg, 0.8 mmol) yielded an anomer mixture (α/β , 0.08:1) α/β -L-(OAc)₄-Man-Py- γ [3(R)NHCbz]NHBoc (**27 C**) as yellowish solid (573 mg, 0.71 mmol, 89%), after purification by column chromatography (Toluene/EtOAc, gradient 2:1 to 1:2). Only ¹H-NMR and ¹³C-NMR signals of β anomer were assigned. **¹H-NMR** [400 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 1.36 (s, 9H, NHCOOC(CH₃)₃), 1.92 (s, 3H, COCH₃), 2.01 (s, 3H, COCH₃), 2.03 (s, 3H, COCH₃), 2.17 (s, 3H, COCH₃), 2.35-2.41 (m, 2H, CH₂ γ c), 2.96-3.08 (m, 2H, CH₂ γ a), 3.77 (s, 3H, NCH₃), 3.96-3.87 (m, 1H, CH₂ γ b), 3.99 (dd, J = 12.1, 2.3 Hz, 1H, CH6), 4.04 (ddd, J = 10.0, 5.0, 2.3 Hz, 1H, CH5), 4.18 (dd, J = 12.1, 5.0 Hz, 1H, CH6), 4.98 (d, J = 3.0 Hz, 1H, NHCOOCH₂Ph), 5.07 (dd, J = 10.0, 10.0 Hz, 1H, CH4), 5.24 (dd, J = 3.5, 1.4 Hz, 1H, CH2), 5.36 (dd, J = 10.0, 3.5 Hz, 1H, CH3), 5.82 (dd, J = 8.9, 1.4 Hz, 1H, CH1), 6.77 (d, J = 1.9 Hz, 1H, CH Py-3^B), 6.80 (d, J = 5.9 Hz, 1H, NHCOOC(CH₃)₃), 7.04 (d, J = 8.4, 1H, NHCOOCH₂Ph), 7.25 (d, J = 1.9 Hz, 1H, CH Py-5^B), 7.28-7.35 (m, 5H, NHCOOCH₂Ph), 8.56 (d, J = 8.9 Hz, 1H, NH5), 9.78 (s, 1H, NH4). **¹³C NMR** [100 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 20.4 (COCH₃), 20.5 (COCH₃), 20.6 (COCH₃), 21.1 (COCH₃), 28.2 (NHCOOC(CH₃)₃), 36.2 (NCH₃), 38.3 (CH₂ γ a), 43.4 (CH₂ γ c), 48.7 (CH₂ γ b), 62.2 (CH₂6), 65.1 (NHCOOCH₂Ph), 65.4 (CH4), 69.4 (CH2), 71.0 (CH3), 72.9 (CH5), 76.5 (CH1), 77.7 (NHCOOC(CH₃)₃), 105.4 (CH Py-3^B), 119.2 (CH Py-5^B), 121.3 (C Py-2), 121.9 (C Py-4), 127.6 (NHCOOCH₂Ph), 127.7 (NHCOOCH₂Ph), 128.3 (NHCOOCH₂Ph), 137.1 (NHCOOCH₂Ph), 155.4 (NHCOOCH₂Ph), 155.8 (NHCOOC(CH₃)₃), 160.5 (CONH5), 167.0 (CONH4), 169.5 (COCH₃), 169.6 (COCH₃), 170.1 (COCH₃), 170.3 (COCH₃). **MS** [ESI, (m/z)]: 804.3 [M + H]⁺, 826.3 [M + Na]⁺, 1607.6 [2M + H]⁺. **HRMS** [ESI, (m/z)]: calcd for C₃₇H₄₉O₁₅N₅ [M+H]⁺ = 803.3225, found 803.3238. **FTIR** [ν (cm⁻¹)]: 3363, 2977, 1752, 1509, 1368, 1229, 1055, 740, 698, 598. **Elem. Anal.** calcd for C₃₇H₄₉O₁₅N₅: C 55.29%, H 6.14%, N 8.71%; found: C 54.95%, H 6.35%, N 8.53% R_F = 0.25 (Toluene/AcOEt, 2:1).

General procedure for synthesis of (OAc)Sugar-Py- γ [3(R)NHCbz]-Py-Ind (28A-C)

The suitable (OAc)Sugar-Py- γ [3(R)NHCbz]NHBoc (**27A-C**) (1 equiv.) was dissolved in TFA (20 equiv.)/CH₂Cl₂ (1:5) and stirred for 1 hour and 30 min at rt. The mixture was diluted with DCM, evaporated and washed with sodium bicarbonate solution, the organic layer was separated, dried over MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to yield the proper amine (OAc)Sugar-Py- γ [3(R)NHCbz]NH₂ (**10A-C**). Compounds **10A-C** were used in the next step without further purification.

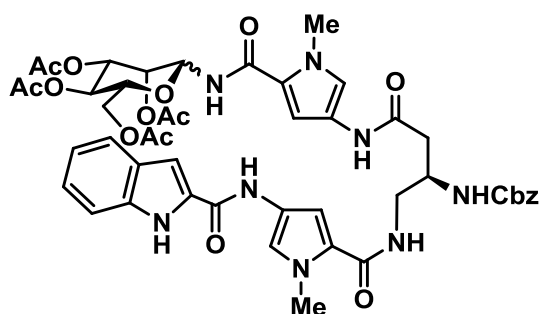
A solution of acid OH-Py-Ind (**11**) (1 equiv.), PyBOP (1.1 equiv.) and DIPEA (2 equiv.) in DMF were stirred at rt under argon atmosphere for 1 h. Then, a solution of the suitable amine **10A-C** (1.1 equiv.) in DMF was added to the reaction mixture and stirred overnight. Next, solvent was evaporated and the product was purified by column chromatography yielding the title compounds **28A-C**.

$$\beta\text{-D-(OAc)}_3\text{Xyl-Py-}\gamma[3(R)\text{NHCbz}]\text{-Py-Ind (28A)}$$


According to the general procedure, β -(OAc)₃Xyl-Py- γ [3(R)NHCbz]NHBoc (**27A**) (151 mg, 0.21 mmol) afforded amine β -(OAc)₃Xyl-Py- γ [3(R)NHCbz]NH₂ (**10A**) (130 mg, >95%). Coupling of amine **10A** with acid **11** (51 mg, 0.18 mmol) yielded the title compound **28A** (105 mg, 65%) as a pale yellow solid after purification by column chromatography (Tol/MeOH, 10:1). ¹H-NMR [500 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 1.90 (s, 3 H, COCH₃), 1.97 (s, 3 H, COCH₃), 2.00 (s, 3 H, COCH₃), 2.44 – 2.47 (m, 2 H, CH₂ γ C), 3.33–3.36 (m, 2 H, CH₂ γ A), 3.56 (dd, J = 10.9, 10.9, 1H, CH^{5'}), 3.77 (s, 3 H, NCH₃^B), 3.82 (s, 3 H, NCH₃^A), 3.90 (dd, J = 10.9, 5.6, 1 H, CH⁵), 4.08–4.12 (m, 1H, CH γ b), 4.81 (ddd, J = 10.9, 10.1, 5.6, 1H, CH⁴), 5.01 (d, J = 6.8, 2 H, NHC^{OO}CH₂Ph), 5.06 (dd, J = 9.3, 9.3, 1 H, CH²), 5.25 – 5.37 (m, 2 H, CH³, CH¹), 6.74 (d, J = 1.9, 1 H, CH Py-3^B), 6.90 (d, J = 1.9, 1 H, CH Py-3^A), 7.05 (dd, J = 7.4, 7.4, 1 H, CH Ind-5), 7.16 – 7.22 (m, 3 H, CH Ind-6, CH Py-5^A, NHC^{OO}CH₂Ph), 7.25 – 7.33 (m, 7 H, NHC^{OO}CH₂Ph, CH Py-5^B, CH Ind-3), 7.46 (d, J = 8.2, 1 H, CH Ind-7), 7.65 (d, J = 7.4, 1H, CH Ind-4), 8.06 (t, J = 6.1, 1 H, NH³), 8.59 (d, J = 9.5, 1 H, NH⁵), 9.85 (s, 1H, NH⁴),

10.30 (s, 1 H, NH₂), 11.60 (s, 1 H, NH₁). ¹³C NMR [125 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 20.8 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 36.5 (NCH₃), 36.6 (NCH₃), 42.6 (CH γ_a), 49.1 (CH γ_c), 56.3 (CH γ_b), 63.7 (CH₅), 65.6 (NHCOOCH₂Ph), 69.1 (CH₄), 71.0 (CH₂), 73.2 (CH₃), 78.2 (CH₁), 103.2 (CH Ind-3), 104.7 (CH Py-3^A), 105.2 (CH Py-3^B), 112.7 (CH Ind-7), 118.7 (CH Py-5^A), 119.5 (CH Py-5^B), 120.22 (CH Ind-5), 122.0 (CH Ind-4), 122.0 (C Py), 122.1 (C Py), 122.5 (C Py), 123.5 (CH Ind-6), 123.8 (C Ind), 127.6 (C Ind), 128.1 (NHCOOCH₂Ph), 128.1 (NHCOOCH₂Ph), 128.7 (NHCOOCH₂Ph), 132.1 (C Py), 137.0 (C Ind), 137.5 (NHCOOCH₂Ph), 156.1 (NHCOOCH₂Ph), 158.6 (CONH), 161.5 (CONH), 161.9 (CONH), 167.5 (CONH), 169.6 (COCH₃), 170.0 (COCH₃), 170.1 (COCH₃). MS [ESI, (m/z)]: 897.3 [M + H]⁺, 919.3[M + Na]⁺. HRMS [ESI, (m/z)]: calcd for C₄₄H₄₈O₁₃N₈ [M+H]⁺ = 896.3345; found, 896.3317. R_F = 0.16 (Tolueno/MeOH, 5:1). [α]_D²⁵ = -2.8 (c = 0.93 in DMSO).

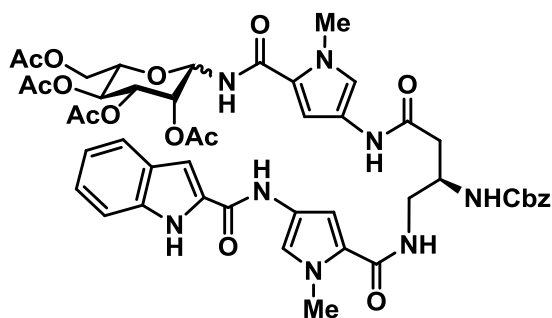
α/β-D-(OAc)₄Man-Py-γ[3(R)NHCbz]-Py-Ind (28B)



According to the general procedure, α/β-D-(OAc)₄Man-Py-γ[3(R)NHCbz]NHBoc (**27B**) (348 mg, 0.43 mmol) afforded amine α/β-D-(OAc)₄Man-Py-γ[3(R)NHCbz]NH₂ (**10B**) (260 mg, 0.37 mmol, 86%). Coupling of amine **10B** with acid **11** (105 mg, 0.37 mmol) yielded the title compound **28B** (316 mg, 0.33 mmol, 88%) as a pale yellow solid after purification by column chromatography (Tol/MeOH, 10:1). Only β anomer was assigned. ¹H-NMR [500 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 1.92 (s, 3H, COCH₃), 2.01 (s, 3H, COCH₃), 2.03 (s, 3H, COCH₃), 2.17 (s, 3H, COCH₃), 2.46 (d, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂ γ_c), 3.32 – 3.34 (m, 2H, CH₂ γ_a), 3.77 (s, 3H, NCH₃^B), 3.82 (s, 3H, NCH₃^A), 4.00 (dd, J = 11.9, 2.7 Hz, 1H, CH₂6), 4.04 (ddd, J = 9.9, 5.1, 2.7, 1H, CH₅), 4.07 – 4.13 (m, 1H, γ_b), 4.18 (dd, J = 11.9, 5.1 Hz, 1H, CH₂6), 5.01 (d, J = 6.3 Hz, 2H, NHCOOCH₂Ph), 5.08 (dd, J = 9.9, 9.9 Hz, 1H, CH₄), 5.25 (dd, J = 3.5, 1.4 Hz, 1H, CH₂), 5.36 (dd, J = 9.9, 3.5 Hz, 1H, CH₃), 5.83 (dd, J = 8.8, 1.4 Hz, 1H, CH₁), 6.78 (d, J = 1.9 Hz, 1H, CH Py-3^B), 6.91 (d, J = 1.9 Hz, 1H, CH Py-3^A), 7.05 (ddd, J = 8.0, 7.0, 1.0 Hz, 1H, CH Ind-5), 7.14 – 7.22 (m, 2H, CH Ind-6, CH Py-5^B, NHCOOCH₂Ph), 7.24 – 7.33 (m, 7H, NHCOOCH₂Ph, CH Py-5^B, CH Ind-3), 7.46 (dd, J = 8.2, 1.0 Hz, 1H, CH Ind-7), 7.65 (dd, J = 8.0, 1.0 Hz, 1H, CH Ind-4), 8.06 (t, J = 5.9 Hz, 1H, NH₃), 8.57 (d, J = 8.8 Hz, 1H, NH₅), 9.83 (s, 1H, NH₄), 10.31 (s, 1H, NH₂), 11.60 (s, 1H, NH₁). ¹³C NMR [125 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 20.4 (COCH₃),

20.5 (COCH₃), 20.6 (COCH₃), 21.1 (COCH₃), 36.1 (NCH₃), 36.2 (NCH₃), 38.4 (CH γ c), 42.2 (CH γ a), 48.7 (CH γ b), 62.2 (CH₂6), 65.2 (NHCOOCH₂Ph), 65.4 (CH₄), 69.4 (CH₂), 71.0 (CH₃), 72.9 (CH₅), 76.5 (CH₁), 102.8 (CH Ind-3), 104.3 (CH Py-3^A), 105.5 (CH Py-3^B), 112.3 (CH Ind-7), 118.3 (CH Py-5^A), 119.3 (CH Py-5^B), 119.8 (CH Ind-5), 121.3 (CH Ind-4), 121.6 (C Py), 121.7 (C Py), 121.9 (C Py), 123.1 (CH Ind-6), 123.4 (C Ind), 127.1 (C Ind), 127.6 (NHCOOCH₂Ph), 127.7 (NHCOOCH₂Ph), 128.3 (NHCOOCH₂Ph), 131.7 (C Py), 136.6 (C Ind), 137.1 (NHCOOCH₂Ph), 155.6 (NHCOOCH₂Ph), 158.2 (CONH), 160.5 (CONH), 161.5 (CONH), 162.3 (CONH), 167.1 (CONH), 169.5 (COCH₃), 169.6 (COCH₃), 170.1 (COCH₃), 170.4 (COCH₃). **MS** [ESI, (m/z)]: 969.3 [M + H]⁺, 991.3[M + Na]⁺. **HRMS** [ESI, (m/z)]: calcd for C₄₇H₅₂O₁₅N₈ [M]⁺ = 968.3552; found, 968.3507. **FTIR** [ν (cm⁻¹)]: 3374, 2941, 1748, 1655, 1516, 1403, 1369, 1240, 1055, 848, 774, 748, 698, 598. **Elem. Anal.** calcd for C₄₇H₅₂O₁₅N₈: C 58.26%, H 5.41%, N 11.56%; found: C 56.60%, H 5.66%, N 11.06%. *R_F* = 0.11 (Tolueno/MeOH, 5:1).

α/β -L-(OAc)₄Man-Py- γ [3(R)NHCbz]-Py-Ind (28C)



According to the general procedure, α/β -

L-(OAc)₄Man-Py- γ [3(R)NHCbz]NHBoc (27C) (444 mg, 0.55 mmol) afforded amine α/β - L-(OAc)₄Man-Py- γ [3(R)NHCbz]NH₂ (10C) (326 mg, 0.46 mmol, 84%). Coupling of amine 10C with acid 11 (130 mg, 0.46 mmol) yielded the title compound 28C

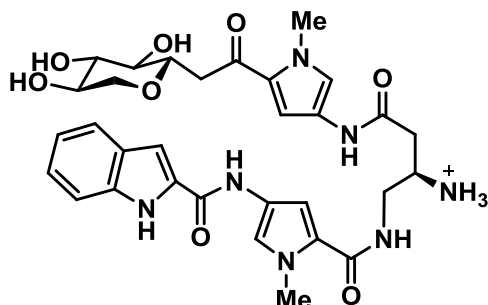
(357 mg, 0.37 mmol, 67%) as a pale yellow solid after purification by column chromatography (Tol/ Acetone, gradient 50:1 to 1:1). Only β anomer was assigned. **¹H-NMR** [500 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 1.92 (s, 3H, COCH₃), 2.00 (s, 3H, COCH₃), 2.03 (s, 3H, COCH₃), 2.17 (s, 3H, COCH₃), 2.46 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂ γ c), 3.32 – 3.35 (m, 2H, CH₂ γ a), 3.77 (s, 3H, NCH₃^B), 3.82 (s, 3H, NCH₃^A), 3.99 (dd, *J* = 12.2, 2.5 Hz, 1H, CH₂6), 4.04 (ddd, *J* = 9.9, 5.1, 2.5 Hz, 1H, CH₅), 4.07 – 4.13 (m, 1H, γ b), 4.18 (dd, *J* = 12.2, 5.1 Hz, 1H, CH₂6), 5.00 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, NHCOOCH₂Ph), 5.07 (dd, *J* = 10.0, 10.0 Hz, 1H, CH₄), 5.24 (dd, *J* = 3.5, 1.3 Hz, 1H, CH₂), 5.36 (dd, *J* = 10.0, 3.5 Hz, 1H, CH₃), 5.82 (dd, *J* = 8.9, 1.3 Hz, 1H, CH₁), 6.77 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, CH Py-3^B), 6.90 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, CH Py-3^A), 7.05 (ddd, *J* = 8.0, 6.9, 1.0 Hz, 1H, CH Ind-5), 7.11 – 7.22 (m, 2H, CH Ind-6, NHCOOCH₂Ph), 7.26 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, CH Py-5^B), 7.27 – 7.32 (m, 7H, NHCOOCH₂Ph, CH Py-5^B, CH Ind-3), 7.46 (dd, *J* = 8.2, 1.0 Hz, 1H, CH Ind-7), 7.65 (dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz,

¹H, CH Ind-4), 8.06 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH3), 8.57 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, NH5), 9.82 (s, 1H, NH4), 10.30 (s, 1H, NH2), 11.60 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, NH1). ¹³C NMR [125 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 20.4 (COCH₃), 20.5 (COCH₃), 20.6 (COCH₃), 21.0 (COCH₃), 36.1 (NCH₃), 36.2 (NCH₃), 38.4 (CH γ c), 42.2 (CH γ a), 48.7 (CH γ b), 62.2 (CH₂6), 65.2 (NHCOOCH₂Ph), 65.4 (CH4), 69.4 (CH2), 71.0 (CH3), 72.9 (CH5), 76.5 (CH1), 102.8 (CH Ind-3), 104.3 (CH Py-3^A), 105.4 (CH Py-3^B), 112.3 (CH Ind-7), 118.3 (CH Py-5^A), 119.3 (CH Py-5^B), 119.8 (CH Ind-5), 121.3 (CH Ind-4), 121.5 (C Py), 121.7 (C Py), 121.9 (C Py), 123.1 (CH Ind-6), 123.4 (C Ind), 127.1 (C Ind), 127.6 (NHCOOCH₂Ph), 127.7 (NHCOOCH₂Ph), 128.3 (NHCOOCH₂Ph), 131.6 (NHCOOCH₂Ph), 136.6 (C Ind), 137.1 (NHCOOCH₂Ph), 155.6 (NHCOOCH₂Ph), 158.2 (CONH), 160.4 (CONH), 161.5 (CONH), 162.4 (CONH), 167.1 (CONH), 169.5 (COCH₃), 169.6 (COCH₃), 170.1 (COCH₃), 170.3 (COCH₃). **MS** [ESI, (*m/z*): 969.5 [*M* + *H*]⁺. **HRMS** [ESI, (*m/z*): calcd for C₄₇H₅₂O₁₅N₈ [*M*]⁺ = 968.3552; found, 968.3557. **FTIR** [ν (cm⁻¹): 3379, 2940, 1750, 1655, 1439, 1515, 1403, 1369, 1240, 1055, 848, 774, 748, 698, 598. **Elem. Anal.** calcd for C₄₇H₅₂O₁₅N₈: C 58.26%, H 5.41%, N 11.56%; found: C 56.16%, H 5.72%, N 11.20%. *R*_F = 0.1 (Tolueno/Acetone, 2:1).

General procedure for deacetylation under Zemplen's²⁶ conditions followed by Cbz deprotection

A required volume of solution of sodium ethoxide in MeOH (0.5 M) was added to a cooled solution of the appropriate (OAc)Sugar-Py- γ [3(*R*)NHCbz]-Py-Ind (**28A-C**) in MeOH, at 0 °C. The final concentration of sodium ethoxide in the reaction mixture should be around 0.05 M. Then, the reaction mixture is allowed to warm to rt and stirred for 45 min. Next, the solution was acidified to pH = 6 with Amberlite IR-120 ion-exchange resin (H⁺ form). The resin was removed by filtration, washed with MeOH and the solvent evaporated on the rotary evaporator, to afford the compounds (**29A-C**). Subsequently, a solution of deprotected sugar derivative, Sugar-Py- γ [3(*R*)NHCbz]-Py-Ind (**29A-C**) and Pd/C 10% wt (20 % mol) in DMF, was shaken at room temperature for 6-12 h under H₂ atmosphere at 40 psi. When reaction was completed, the catalyst was removed by filtration with a nylon filter, washed with DMF and MeOH, and the solvent evaporated *in vacuo* providing the free amine Sugar-Py- γ [3(*R*)NH₂]-Py-Ind.

²⁶Ashton, P.R.; Boyd, S.U.; Brown, C.L.; Jayaraman, N.; Nepogodiev, S.A.; Stoddart, J.F. *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1115-1128.

β -D-Xyl-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2)

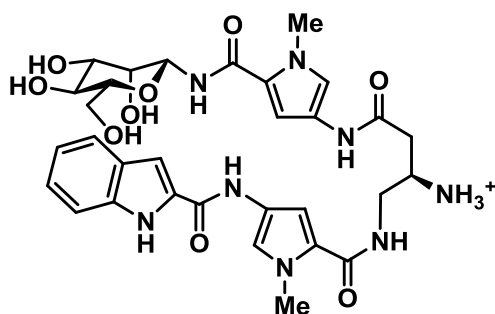
According to general procedure, β -D-(OAc)₃Xyl-Py- γ [3(R)NHCBz]-Py-Ind (**28A**) (80 mg, 0.09 mmol) afforded compound (**29A**) (48 mg, 70%) as a white solid, which was used in the next step without further purification.

Catalytic hydrogenation of **29A** provided amine form of compound (**2**) β -D-(OAc)₃Xyl-Py- γ [3(R)NH₂]-Py-Ind (32 mg, 80%) as a yellow solid. ¹H-NMR [500 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 2.19 (dd, J = 14.6, 8.3, 1 H, CH γ C), 2.32-2.34 (m, 1H, CH γ C), 3.05 (dd, J = 10.8, 10.8, 1H, H5'), 3.13-3.17 (m, 2 H, CH γ a, CH3), 3.20-3.30 (m, 4 H, CH γ a, CH γ b, CH₄, CH₂), 3.66 (dd, J = 10.8, 5.3, 1H, CH5), 3.78 (s, 3 H, NCH₃^B), 3.84 (s, 3 H, NCH₃^A), 4.77 (dd, J = 8.9, 8.9, 1H, CH1), 4.84 (d, J = 5.7, 1H, OH), 4.93 (d, J = 5.7, 1H, OH), 5.01 (d, J = 5.7, 1H, OH), 6.84 (d, J = 1.8, 1H, CH Py-P3^B), 6.92 (d, J = 1.9, 1H, CH Py-3^A), 7.05 (ddd, J = 7.9, 7.0, 1.0, 1H, CH Ind-5), 7.17 - 7.21 (m, 2H, CH Ind-6, CH Py-5^B), 7.28 (dd, J = 2.1, 1.0, 1H, CH Ind-3), 7.29 (d, J = 1.9, 1H, CH Py-5^A), 7.46 (dd, J = 8.2, 1.0, 1 H, CH Ind-7), 7.65 (dd, J = 8.1, 1.0, 1H, CH Ind-4), 8.06 (t, J = 5.5, 1H, NH3), 8.32 (d, J = 8.7, 1H, NH5), 10.03 (s, 1 H, NH4), 10.29 (s, 1H, NH2), 11.61 (d, J = 2.1, 1H, NH1). ¹³C NMR [125 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 36.5 (NCH₃), 36.6 (NCH₃), 42.0 (CH₂ γ C), 45.7 (CH₂ γ a) 49.3 (CH γ b), 67.8 (CH5), 70.2(CH4), 72.1(CH2), 78.2(CH3), 81.0(CH1), 103.3 (CH Ind-3), 104.7 (CH Py-3^A), 105.0 (CH Py-3^B), 112.7 (CH Ind-7), 118.6 (CH Py-5^A), 119.0 (CH Py-5^B), 120.2 (CH Ind-5), 122.0 (CH Ind-4), 122.1(C Py), 122.3 (C Py), 122.6(C Py), 123.6 (CH Ind-6), 123.8(C Ind), 127.6 (C Ind), 132.09 (C Py), 137.02 (C Ind), 158.6 (CONH), 161.8 (CONH), 161.8 (CONH), 168.8 (CONH). MS [ESI, (m/z)]: 637.3 [M + H]⁺. HRMS [ESI, (m/z)]: calcd for C₃₀H₃₆O₈N₈ [M+H]⁺ = 636.2656; found, 636.2657.

In order to obtain the cationic form of compound (**2**), β -D-(OAc)₃Xyl-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind, amine was treated with HCl 0.5 M and lyophilized to dryness, to afford final cationic compound (**2**). ¹H-NMR [500 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 2.60 (dd, J = 16.7, 7.8, 1 H, CH γ C), 2.67-2.76 (m, 1H, CH γ C), 3.05 (dd, J = 10.8, 10.8 1H, CH5'), 3.16 (dd, J = 8.7, 8.7, 1H, CH3), 3.30-3.33 (m, 2H, CH4, CH2), 3.47 (ddd, J = 20.0, 13.9, 7.7, 2

H, CH γ a), 3.66 (m, 1H, H5, CH γ b), 3.79 (s, 3H, NCH₃^B), 3.86 (s, 3H, NCH₃^A), 4.78 (dd, J = 8.9, 8.9, 1H, CH1), 4.80-5.14 (m, 3H, OH), 6.83 (d, J = 2.1, 1 H, CH Py-3^B), 7.01 (d, J = 2.0, 1H, CH Py-3^A), 7.05 (dd, J = 7.5, 7.5, 1H, CH Ind-5), 7.18 - 7.22 (m, 2H, CH Ind-6, CH Py-5^B), 7.29 (dd, J = 2.1, 0.7, 1H, CH Ind-3), 7.31 (d, J = 2.1, 1 H, CH Py-5^A), 7.46 (d, J = 8.2, 1 H, CH Ind-7), 7.65 (d, J = 8.1, 1 H, CH Ind-4), 7.96 (d, J = 5.5, 3 H, NH₃), 8.30 (t, J = 5.9, 1 H, NH3), 8.37 (d, J = 8.8, 1 H, NH5), 10.17 (s, 1 H, NH4), 10.35 (s, 1 H, NH2), 11.62 (d, J = 2.3, 1 H, NH1). ¹³C NMR [125 MHz, δ (ppm), CD₃SOCD₃]: 36.2 (NCH₃), 36.3 (NCH₃), 35.1 (CH₂ γ c), 40.0(CH₂ γ a), 48.4 (CH γ b), 67.4 (CH5), 69.7 (CH4), 71.6 (CH2), 77.7 (CH3), 80.5 (CH1), 102.9 (CH Ind-3), 104.4 (CH Py-3^A), 104.8 (CH Py-3^B), 112.3 (CH Ind-7), 118.7 (CH Py-5^A), 119.8 (CH Py-5^B), 121.4 (CH Ind-5), 121.5 (CH Ind-4), 121.9 (C Py), 122.4 (C Py), 122.5 (C Py), 123.4 (CH Ind-6), 127.1 (C Ind), 131.6 (C Py), 136.6 (C Ind), 158.3 (CONH), 161.2 (CONH), 162.0 (CONH), 166.1 (CONH). MS [ESI, (m/z)]: 638.3 [M + H]⁺.

β -D-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3)

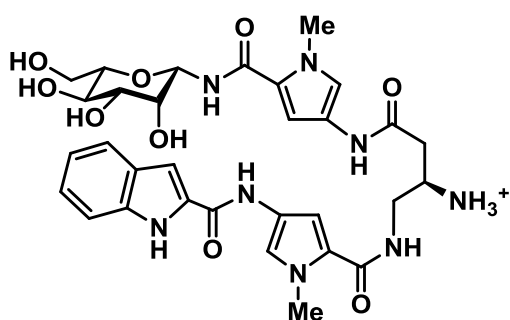


According to general procedure, α/β -D-(OAc)₄Man-Py- γ [3(R)NHCbz]-Py-Ind (**28B**) (150 mg, 0.16 mmol) afforded compound (**29B**) (92 mg, 0.12 mmol, 72%) as a white solid, after purification by reverse phase column chromatography. Catalytic hydrogenation of **29B** provided amine form of compound (**3**) β -

D-Man-Py- γ [3(R)NH₂]-Py-Ind (48 mg, 0.07 mmol, 61%) as a white solid, after purification by reverse-phase semi-preparative HPLC, and lyophilized to dryness. ¹H-NMR [500 MHz, δ (ppm), D₂O]: 2.38 (dd, J = 14.2, 10.0 Hz, 1H, CH₂ γ c'), 2.46 (dd, J = 9.3, 3.8 Hz, 1H, CH3), 2.55 - 2.64 (m, 1H, CH₂ γ c), 2.92 - 3.05 (m, 2H, CH₂ γ a', CH5), 3.06 - 3.14 (m, 1H, CH2), 3.32 - 3.40 (dd, J = 9.3, 9.3 Hz, 1H, CH4), 3.57 (dd, J = 12.4, 6.0 Hz, 1H, CH₂6), 3.62 - 3.69 (m, 1H, CH₂ γ a), 3.70 (s, 3H, NCH₃^B), 3.75-3.77 (m, 2H, CH₂6, γ b), 3.79 (s, 3H, NCH₃^A), 4.14 (br, 1H, CH1), 6.50 - 6.61 (m, 2H, CH Py-3^A, CH Py-3^B), 6.86 (d, J = 1.9 Hz, 1H, CH Py-5^A), 7.01 (d, J = 1.9 Hz, 1H, CH Py-5^B), 7.14 (s, 1H, CH Ind-3), 7.27 (dd, J = 7.5, 7.5 Hz, 1H, CH Ind-5), 7.41 (dd, J = 7.5, 7.5 Hz, 1H, CH Ind-6), 7.62 (d, J = 7.5 Hz, 1H, CH Ind-7), 7.82 (d, J = 7.5 Hz, 1H, CH Ind-4). ¹³C NMR [125 MHz, δ (ppm), D₂O]: 36.0 (NCH₃), 36.1 (NCH₃), 42.4 (CH₂ γ c), 45.0 (CH₂ γ a), 46.9 (CH γ b), 60.6 (CH6), 66.2 (CH4), 69.7 (CH2), 72.9 (CH3), 77.3 (CH5), 77.4 (CH1), 104.1 (CH Ind-3), 105.1 (CH

Py-3^A), 105.8 (CH Py-3^B), 112.2 (CH Ind-7), 119.3 (CH Py-5^A), 120.4 (CH Py-5^B), 120.7 (CH Ind-5), 122.0 (CH Ind-4), 122.2 (C Py), 122.4 (C Py), 122.5 (C Py), 124.9 (CH Ind-6), 127.0 (C Ind), 131.6 (C Ind), 136.6 (C Ind), 159.9 (CONH), 161.2 (CONH), 162.0 (CONH), 166.1 (CONH). **HRMS** [ESI, (m/z)]: calcd for C₃₁H₃₈O₉N₈ [M+H]⁺ = 666.2762; found, 636.2765. **Elem. Anal.** calcd for C₃₂H₃₈O₁₁N₈: C 54.08%, H 5.39%, N 15.77%; found: C 54.61%, H 5.78%, N 15.43%. $[\alpha]_D^{25} = -1.9$ (c = 0.82 in DMSO).

β -L-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4)



According to general procedure, α/β -L-(OAc)₄Man-Py- γ [3(R)NHCbz]-Py-Ind (**28C**) (110 mg, 0.11 mmol) afforded compound (**29C**) (62 mg, 0.08 mmol, 68%) as a white solid, after purification by reverse phase column chromatography. Catalytic hydrogenation of **29C** provided amine form

of compound (**4**) β -L-Man-Py- γ [3(R)NH₂]-Py-Ind (31 mg, 0.04 mmol 59%) as a white solid after purification by reverse-phase semi-preparative HPLC, and lyophilized to dryness. **¹H-NMR** [500 MHz, δ (ppm), D₂O]: 2.24 (dd, *J* = 9.9, 3.3 Hz, 1H, CH₃), 2.52 (dd, *J* = 15.1, 8.1 Hz, 1H, CH₂ γ c'), 2.55 – 2.63 (dd, *J* = 15.1, 2.4 Hz, 1H, CH₂ γ c'), 2.75 – 2.82 (m, 1H, CH₅), 2.96 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, CH₂), 3.19 (dd, *J* = 9.9, 9.9 Hz, 1H, CH₄), 3.30 (dd, *J* = 13.7, 3.8 Hz, 1H, CH₂ γ a), 3.40 (dd, *J* = 12.4, 6.1 Hz, 1H, CH₂6), 3.52 (s, 3H, NCH₃^B), 3.59 (dd, *J* = 12.4, 2.3 Hz, 1H, CH₂6'), 3.64 (s, 3H, NCH₃^A), 3.68 – 3.81 (m, 2H, CH₂ γ a' y CH γ b), 3.98 (br, 1H, CH₁), 6.47 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, CH Py-3^B), 6.55-6.57 (m, 2H, CH Py-3^A, CH Py-5^A), 6.88 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, CH Py-5^B), 6.99 (s, 1H, CH Ind-3), 7.11 (dd, *J* = 8.1, 7.6 Hz, 1H, CH Ind-5), 7.25 (dd, *J* = 8.3, 7.6 Hz, 1H, CH Ind-6), 7.46 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, CH Ind-7), 7.66 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH Ind-4). **¹³C NMR** [125 MHz, δ (ppm), D₂O]: 36.0 (NCH₃), 36.1 (NCH₃), 36.9 (CH₂ γ c), 41.3 (CH₂ γ a), 48.8 (CH γ b), 60.6 (CH₆), 66.1 (CH₄), 69.7 (CH₂), 72.9 (CH₃), 77.3 (CH₅), 77.4 (CH₁), 104.1 (CH Ind-3), 105.5 (CH Py-3^A), 106.3 (CH Py-3^B), 112.3 (CH Ind-7), 119.6 (CH Py-5^B), 120.2 (CH Py-5^A), 120.6 (C Py), 120.8 (CH Ind-5), 120.9 (C Py), 121.6 (C Py), 122.0 (CH Ind-4), 124.9 (CH Ind-6), 127.0 (C Ind), 130.3 (C Ind), 136.6 (C Ind), 162.1 (CONH), 163.7 (CONH), 168.2 (CONH). **HRMS** [ESI, (m/z)]: calcd for C₃₁H₃₈O₉N₈ [M+H]⁺ = 666.2762; found, 636.2753. **Elem. Anal.** calcd for C₃₂H₃₈O₁₁N₈: C 54.08%, H 5.39%, N 15.77%; found: C 54.42%, H 5.56%, N 15.61%. $[\alpha]_D^{25} = -1.2$ (c = 0.79 in DMSO).

3. **CAPÍTULO 3**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES
CONFORMACIONALES Y DE INTERACCIÓN CON ADN DE
LAS GLICO-OLIGOAMIDAS NEUTRAS Y LAS GLICO-
OLIGOAMIDAS CATIÓNICAS**

3.1 Introducción

Dada la cantidad de información estructural valiosa que ha sido posible obtener gracias a las glico-oligoamidas neutras y con la finalidad de poder respaldar nuevos resultados estructurales con datos obtenidos previamente en nuestro grupo de investigación, un objetivo era comprobar si existía similitud conformacional en agua en el estado libre de ambos tipos de glico-oligoamidas, neutras y catiónicas. También se quiso estudiar si la formación del complejo con ADN podía inducir un cambio conformacional en las glico-oligoamidas catiónicas con respecto al estado libre, y así comparar su comportamiento con el de las glico-oligoamidas neutras.

De esta forma surgió la idea de plantear un estudio comparativo estructural del estado libre y enlazado de las glico-oligoamidas neutras y las catiónicas. En principio, uno de los principales objetivos a desarrollar era comprobar si se había logrado una mejora en las propiedades de las glico-oligoamidas neutras que limitaban su estudio, con la modificación del fragmento gamma. Es decir, si se había conseguido una mejora en solubilidad y en afinidad, manteniendo al mismo tiempo su selectividad de secuencia hacia pares de bases AT.

Dados los precedentes existentes de nuestro grupo y los buenos resultados obtenidos inicialmente con la glico-oligoamida neutra de xilosa (**1**) β -D-Xyl-Py- γ -Py-Ind, se decidió realizar este estudio estructural comparativo con las glico-oligoamidas derivadas de este carbohidrato (Figura 3.1).

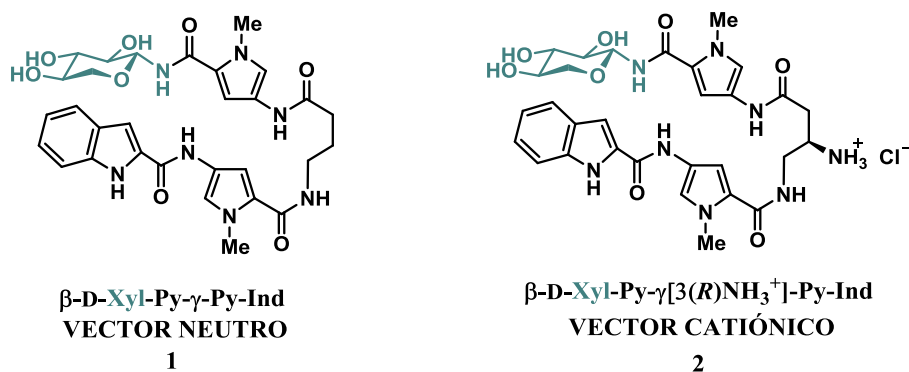


Figura 3.1 Estructura de las glico-oligoamidas, neutra y catiónica, derivadas de D-xilosa.

3.2 Estudio de solubilidad comparativo entre las glico-oligoamidas neutras y las cargadas

La baja solubilidad en agua de las oligoamidas heteroaromáticas es bien conocida. Este problema ha estado siempre presente en la evolución del diseño de las oligoamidas heteroaromáticas de Dervan y Sujiyama. A medida que se incrementa el número de unidades de pirrol e imidazol, disminuye progresivamente la solubilidad de la molécula. Esto supone un problema a la hora de llevar a cabo experimentos de interacción con ADN, *in vitro* e *in vivo*. La solución de Dervan a esta problemática fue la introducción de grupos funcionales que tuvieran una carga positiva para poder formar

la sal y solubilizar mejor la molécula en medio acuoso.¹ También existen ejemplos en la literatura del grupo de Lown, en donde se introducen carbohidratos en la poliamida heteroaromática con intención de mejorar la solubilidad de estos compuestos en agua.²

Teniendo en cuenta lo visto en la literatura, *a priori*, la solubilidad en agua de nuestras glico-oligoamidas neutras no debía ser un problema, ya que sólo poseían dos pirroles y un indol. Además, el carbohidrato contribuiría a solubilizar la molécula. Sin embargo, estos compuestos no fueron tan solubles como cabía esperar, lo cual limitó en cierta medida el uso de varias técnicas biofísicas para el estudio de su interacción con ADN. Por ello, como ya se ha comentado en el primer capítulo, uno de los objetivos que se planteó en esta tesis fue mejorar, en la medida de lo posible, la solubilidad de estos compuestos sin hacer grandes modificaciones en su estructura. Así, se decidió introducir el grupo amino en el fragmento γ y formar su sal correspondiente.

La solubilidad es un parámetro termodinámico, ya que se define como la concentración de saturación de un soluto en disolución, en condiciones específicas de presión y temperatura, donde el equilibrio entre soluto y disolvente se alcanza termodinámicamente. Los valores de solubilidad pueden verse influenciados por diversos factores entre los que se encuentran: la temperatura, el pH (en compuestos ionizables), la cristalinidad y empaquetamiento del sólido, el efecto del ion común, el uso de codisolventes, etc. El procedimiento más empleado para medir la solubilidad termodinámica de un compuesto es el llamado “*shake-flask method*”.³ En este método se parte del compuesto sólido, al que se le añade un determinado volumen del disolvente. A continuación, se deja equilibrar la suspensión, bajo agitación entre 24 y 72 horas, hasta alcanzar un equilibrio. El tiempo de incubación es crucial para no dar un valor erróneo, por lo que se debe constatar que la solubilidad es constante en el tiempo. Debido a los largos tiempos de incubación necesarios para la obtención de resultados fiables y a la cantidad de compuesto empleado, Lipinski y colaboradores desarrollaron a finales de los años 90 un nuevo método de alto rendimiento de determinación de solubilidades, orientado a implementarse en la industria farmacéutica.⁴ A través de esta metodología de alto rendimiento, lo que se determina es la solubilidad cinética en vez de la termodinámica. En el método de Lipinski se parte de una disolución del compuesto en DMSO a la cual se le añade gradualmente el medio acuoso, hasta que se observa precipitado. En este caso lo que se mide es la concentración del compuesto presente en disolución cuando comienza a precipitar, obteniéndose así una solubilidad aparente. Esta técnica puede resultar muy útil a la hora de estimar solubilidades aparentes en etapas tempranas del proceso de descubrimiento de fármacos. Es un protocolo sencillo, rápido y que emplea poca cantidad de materia. No obstante, cuando un compuesto es diluido en una disolución acuosa, partiendo de un patrón de DMSO, esa solubilidad aparente se obtiene de un proceso principalmente cinético. Debido a

¹ Wetzler, M.; University of California, B. *Advances in the Synthesis of DNA-binding Polyamide Ligands, Their Biophysical Characterization, and Effects on Bacterial Sporulation*; University of California, Berkeley, 2007.

² Kumar, R.; Lown, J. W. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2003, 4842-4851.

³ Glomme, A.; März, J.; Dressman, J. B. *J. Pharm. Sci.* **2005**, 94, 1-16.

⁴ Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, 23, 3-25.

ello, la influencia de la energía reticular del cristal y el efecto de las formas polimórficas sobre la solubilidad se pierde en el proceso de disolución en DMSO.⁵ Además, otra desventaja es la presencia de DMSO en la disolución final y la posible formación de disoluciones super saturadas, que en ocasiones llevan a valores de solubilidades alejados de la realidad.

A pesar de las ventajas que puede suponer el cálculo de la solubilidad cinética, en cuanto a tiempo y cantidad de sólido empleado, este dato no suple la necesidad de realizar una medida de solubilidad termodinámica. Por ello, en esta tesis se ha realizado el estudio comparativo de solubilidades entre la glico-oligoamida neutra de manosa, β -D-man-Py- γ -Py-Ind (**35**), y su análoga catiónica β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**), optando por calcular la solubilidad termodinámica mediante el tradicional método *shake-flask*, intentando minimizar la cantidad de sólido empleado. Este protocolo consta de cinco fases: preparación de la recta de calibrado, preparación de la muestra, tiempo de incubación, separación de las fases y análisis de la disolución saturada. El pH escogido para el ensayo fue 7.3, el empleado en los experimentos de interacción con ADN.

Para la preparación de la recta de calibrado se prepararon disoluciones de concentración conocida de cada compuesto, en un rango desde 10 μ M hasta 250 μ M. El análisis de esas disoluciones se hizo mediante HPLC. La recta patrón se generó representando el área media de tres medidas de las señales del cromatograma, frente a la concentración de cada disolución.

Por otro lado, las disoluciones saturadas de cada glico-oligoamida fueron preparadas pesando una cantidad determinada de compuesto, disolviéndolas en 100 μ L de tampón fosfato primero, agitando en un vórtex durante un minuto y añadiendo otros 100 μ L a continuación. Después, se dejaron ambas muestras bajo agitación orbital durante aproximadamente 48 horas a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se centrifugaron las muestras y se separó el sobrenadante del residuo sólido. Por último, las muestras fueron diluidas antes de introducir las en el HPLC para analizarlas y cuantificarlas, con el fin de que la medida entrara dentro de la recta de calibrado. Las integraciones de las señales de HPLC se hicieron tanto en un rango de longitudes de onda (230.0-400.0 nm) como a la longitud de onda del máximo de absorción de las glico-oligoamidas (302 nm). Todas tablas con los valores de dichas integraciones se encuentran en el anexo del capítulo, junto con el tratamiento de los valores obtenidos para cada longitud de onda. A continuación se muestran la rectas de calibrado obtenidas para la glico-oligoamida neutra de D-manosa (β -D-man-Py- γ -Py-Ind **35**) y para su análoga catiónica β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**), con las áreas obtenidas de las medidas realizadas a 302 nm, y ajustadas a un polinomio de primer orden (Figura 3.2 y Figura 3.3).

⁵ Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46, 3.

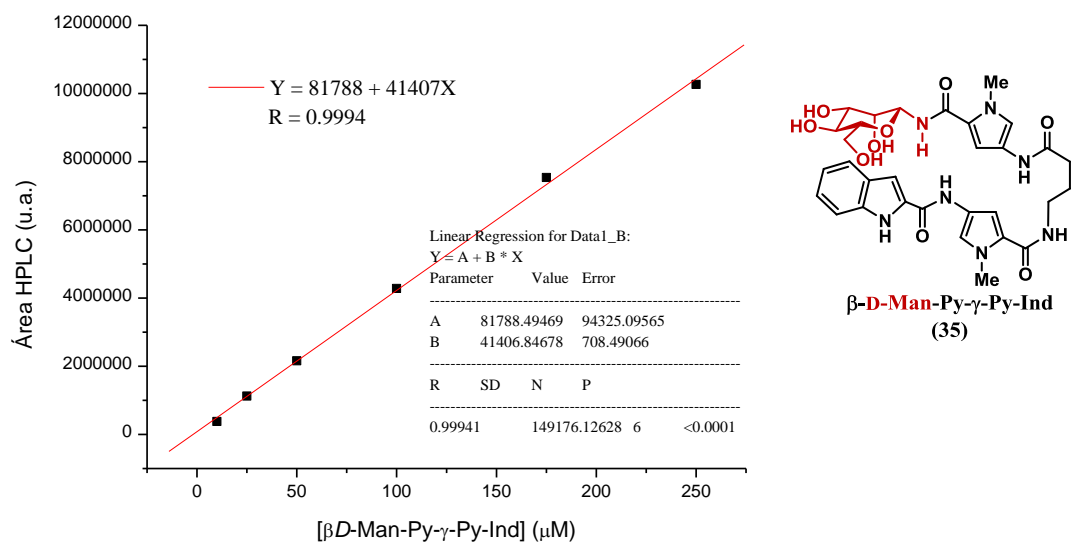


Figura 3.2 Recta de calibrado para la glico-oligoamida neutra derivada de D-manosa 35

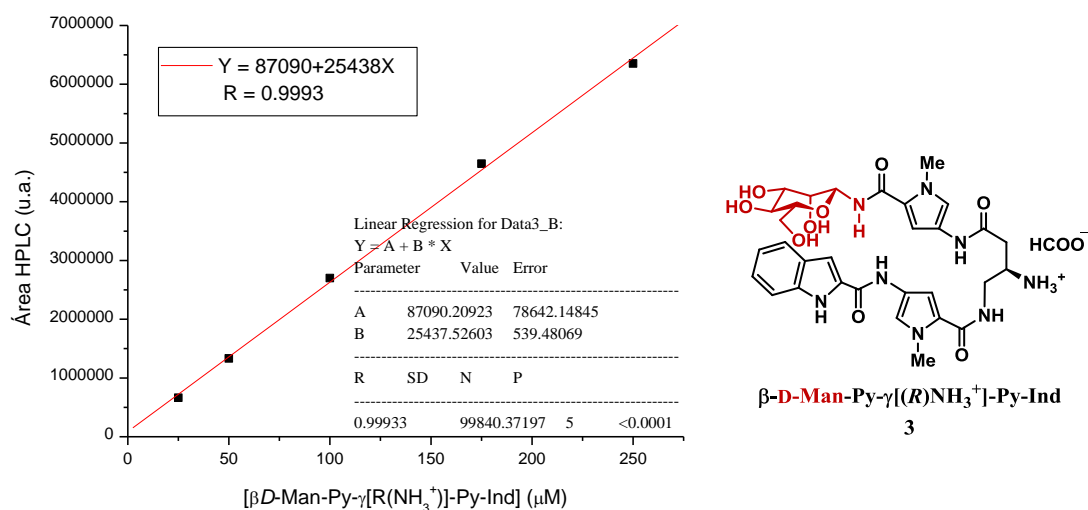


Figura 3.3 Recta de calibrado para la glico-oligoamida catiónica derivada de D-manosa 3.

Las concentraciones encontradas en el sobrenadante de las disoluciones saturadas han sido de 1.404 mM para la glico-oligoamida neutra de manosa (β-D-Man-Py-γ-Py-Ind) y de 2.592 mM para la glico-oligoamida catiónica de manosa β-D-Man-Py-γ[(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**). Por lo tanto, se ha logrado duplicar la solubilidad de las glico-oligoamidas gracias a la introducción del grupo amino en el fragmento γ.

3.3 Estudio conformacional en agua de las glico-oligoamidas, neutra y catiónica, derivadas de xilosa

La estructura tridimensional y la dinámica de un ligando en estado libre juegan un papel muy importante en procesos de reconocimiento molecular. En los casos en que el ligando es flexible en disolución, la pérdida de grados de libertad que implica el proceso de asociación constituye una de las mayores contribuciones entrópicas que desfavorecen dicho proceso. Por ello, una posible estrategia en el diseño de ligandos eficaces consiste en bloquear el ligando en su conformación bioactiva.⁶

En las glico-oligoamidas, la posibilidad de giro en torno a los enlaces C-N y C-C de los grupos amida y de la cadena γ hace que estas moléculas sean flexibles. Por ello, este tipo de estructuras en disolución presentan un equilibrio conformacional en el que coexisten un determinado número de conformaciones diferentes, tanto plegadas como abiertas (Figura 3.4). Estudios previos de nuestro grupo de investigación llevados a cabo con las glico-oligoamidas neutras por RMN en el estado libre, pusieron de manifiesto la presencia de un porcentaje de conformación en forma de horquilla en disolución acuosa.⁷ Gracias a esto estudios, se confirmó que estos ligandos neutros poseen características estructurales que favorecen una conformación plegada en disolución acuosa, similar a la conformación plegada bioactiva que presentan en el estado asociado las oligomidas de Dervan, estructuralmente más complejas.⁸ Esta conformación plegada en las oligoamidas, se ve favorecida en agua gracias a las interacciones no covalentes π - π entre los dos pirroles enfrentados entre sí. Además, también contribuyen a la estabilización de esta conformación las interacciones CH- π establecidas entre el carbohidrato y el indol.

Las glico-oligoamidas catiónicas no introducen grandes cambios estructurales con respecto a sus análogos neutros, por lo que cabía esperar similitud conformacional en disolución acuosa en el estado libre. Con objeto de confirmar esta hipótesis, y determinar la existencia de un porcentaje de conformación plegada en forma de horquilla en disolución acuosa, se planteó la realización de estudios conformacionales por RMN.

⁶ (a) Barnett-Norris, J.; Guarnieri, F.; Hurst, D. P.; Reggio, P. H. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4861-4872. (b) Hodge, C. N.; Aldrich, P. E.; Wasserman, Z. R.; Fernandez, C. H.; Nemeth, G. A.; Arvanitis, A.; Cheeseman, R. S.; Chorvat, R. J.; Ciganek, E.; Christos, T. E.; Gilligan, P. J.; Krenitsky, P.; Scholfield, E.; Strucely, P. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 819-832. (c) Bastida, A.; Hidalgo, A.; Chiara, J. L.; Torrado, M.; Corzana, F.; Pérez-Cañadillas, J. M.; Groves, P.; Garcia-Junceda, E.; Gonzalez, C.; Jimenez-Barbero, J.; Asensio, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 100-116.

⁷ Martin, J. N.; Muñoz, E. M.; Schwergold, C.; Souard, F.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Cañada, J.; Vicent, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9518-9533.

⁸ Hawkins, C. A.; de Clairac, R. P.; Dominey, R. N.; Baird, E. E.; White, S.; Dervan P. B.; Wemmer, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5235-5243.

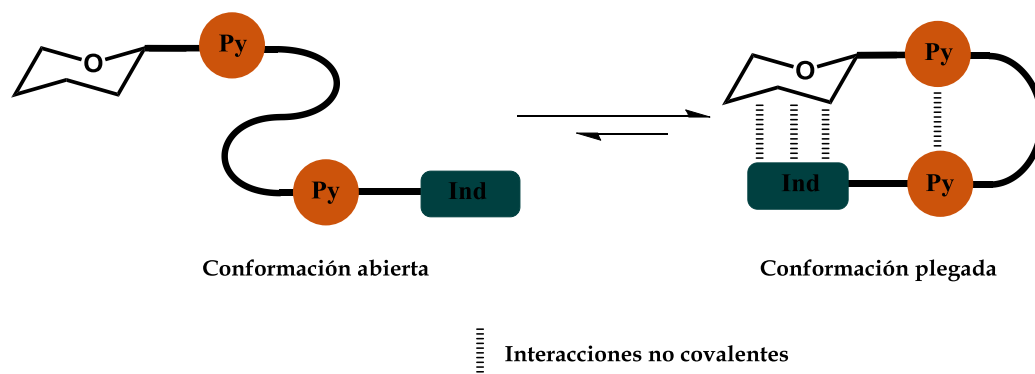


Figura 3.4 Representación esquemática del equilibrio conformacional de las glico-oligoamidas en disolución.

3.3.1 Asignación del espectro ^1H -RMN de las glico-oligoamidas de D-xilosa neutra (1) y cargada (2) en disolución acuosa

En primer lugar, previo al estudio estructural, fue necesaria la asignación de los desplazamientos químicos correspondientes a las glico-oligoamidas de D-xilosa neutra (1) y cargada (2), en los espectros ^1H -RMN obtenidos en D_2O a 25°C , mediante experimentos tanto monodimensionales como bidimensionales. Asimismo, también se asignó el modelo de D-xilosa, β -D-xil-Py-NHAc (5) en las mismas condiciones. Para completar la asignación, identificando y asignando los protones correspondientes a las amidas, fue también necesario realizar espectros de monodimensionales y NOESY bidimensionales en $90\text{ H}_2\text{O}/10\text{ D}_2\text{O}$ a 5°C .

Los espectros de protón de las glico-oligoamidas neutras (Figura 3.5) y de sus análogas catiónicas (Figura 3.6) son similares, pudiéndose distinguir tres regiones espectrales diferentes que se detallan a continuación.

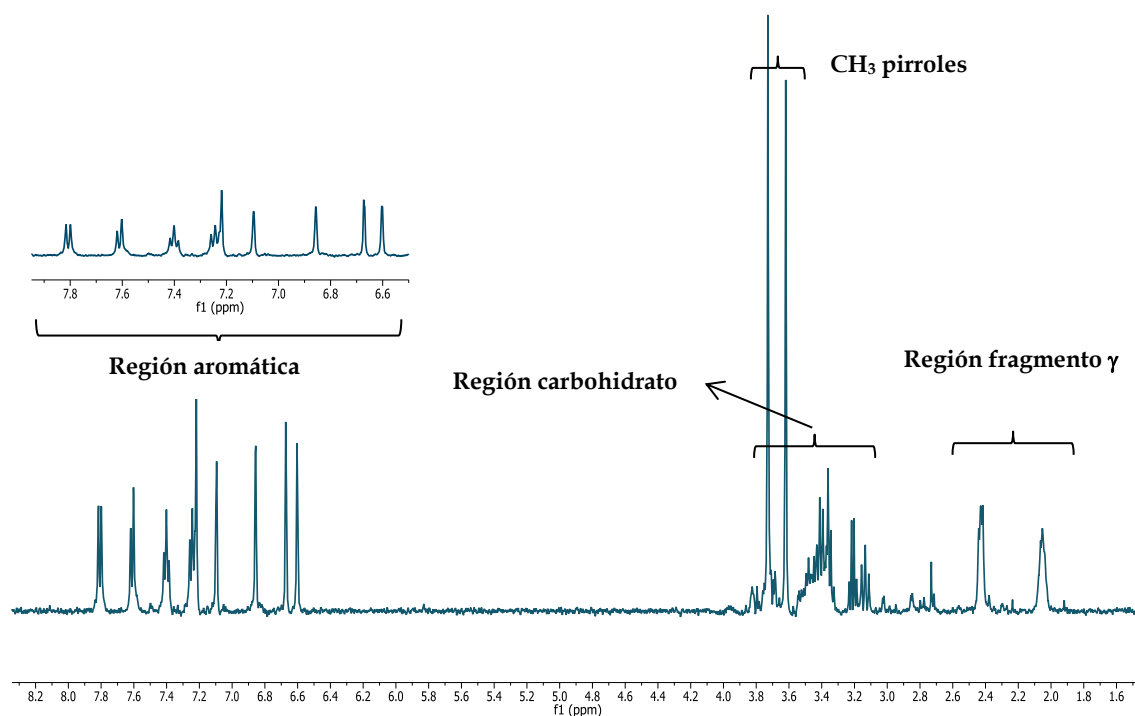


Figura 3.5 Espectro ^1H -RMN de la glico-oligoamida neutra de D-xilosa (1) en D_2O a 25°C , adquirido con supresión de la señal de agua residual (se pierde la señal del protón anomérico de la xilosa).

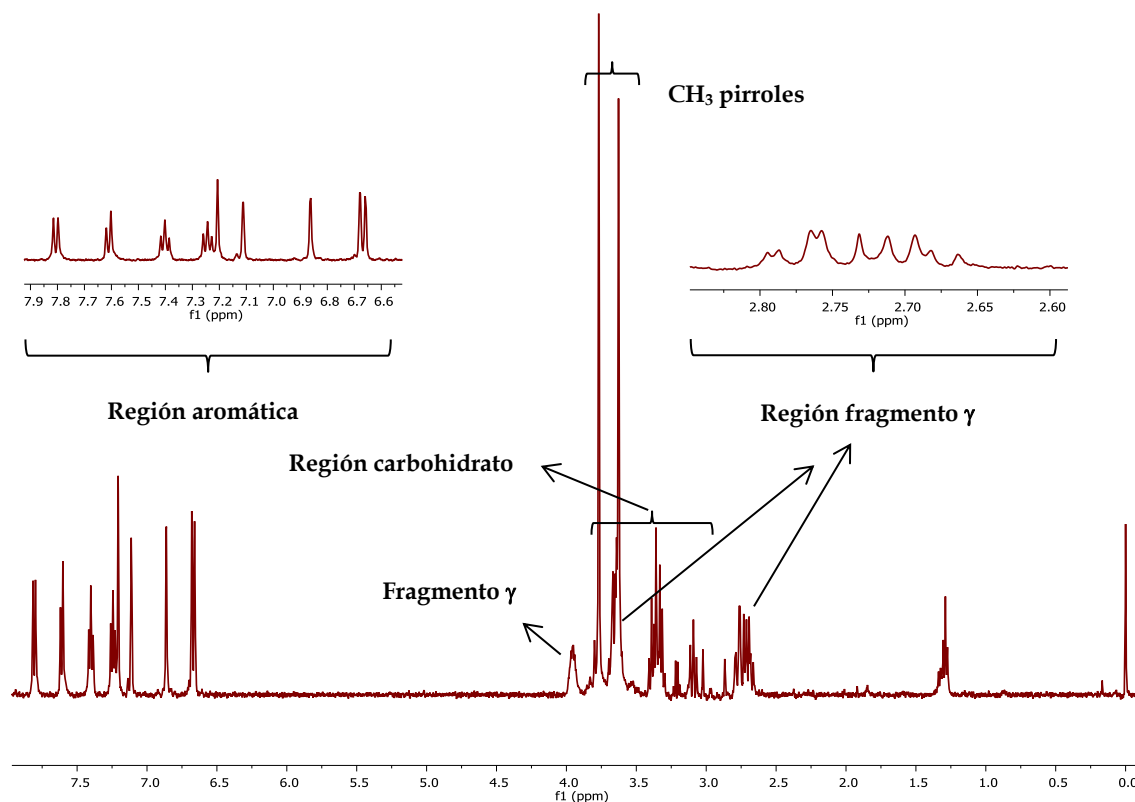


Figura 3.6 Espectro ^1H -RMN de la glico-oligoamida catiónica de D-xilosa (2) en D_2O a 25°C , adquirido con supresión de la señal de agua residual (se pierde la señal del protón anomérico de la xilosa).

- En la región entre 6.5 y 8 ppm se encuentran las resonancias correspondientes a los protones aromáticos de la oligoamida (pirroles e indol).
- En la zona intermedia del espectro, entre 3.0 y 4.0 ppm, aparecen las resonancias correspondientes a los protones del carbohidrato, excepto el anomérico,⁹ y resonancias de los grupos metilo de los pirroles. Además, en el caso de las glico-oligoamidas catiónicas, en este rango también se encuentra el protón γ_b del fragmento γ .
- Por último, entre 2.0 y 3.5 ppm se observan las resonancias correspondientes a los CH_2 de la cadena γ .

La nomenclatura empleada para designar y distinguir los protones del fragmento oligoamídico de los ligandos estudiados se describe en la siguiente figura (Figura 3.7).¹⁰

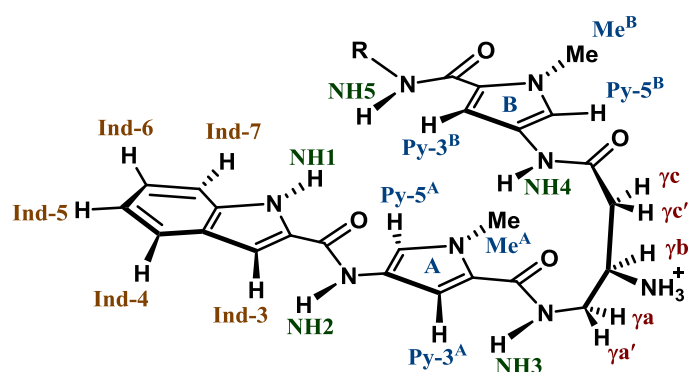


Figura 3.7 Nomenclatura utilizada en la asignación de las resonancias del fragmento de oligoamida de las glico-oligoamidas (1-4)

Para designar los protones del carbohidrato se utilizó la nomenclatura IUPAC correspondiente al anillo de piranosa (Figura 3.8).

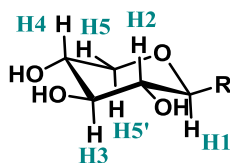


Figura 3.8 Nomenclatura utilizada para designar los protones pertenecientes al carbohidrato de las glico-oligoamidas de xilosa 1 y 2

En la tabla mostrada a continuación (Tabla 3.1) se observan las asignaciones correspondientes a ambas glico-oligoamidas de xilosa, tanto la neutra (**1**) como la catiónica (**2**). Los espectros COSY y ROESY en D_2O permitieron la asignación de las resonancias del anillo indol. El comienzo de la asignación del indol se realizó empleando el ROESY. El nOe entre Ind-3 e Ind-4 fue el punto de inicio para esta asignación. También se identificaron los protones de los pirroles: Py-5, Py-3 y Me. Sin

⁹ El protón anomérico del carbohidrato no aparece en los espectros mostrados de ^1H -RMN en D_2O de ambas glico-oligoamidas debido a la supresión de la señal de disolvente empleado.

¹⁰ En el inicio de la tesis se ha incluido un apéndice de nomenclatura donde se explica en detalle la nomenclatura y numeración empleadas a lo largo de la tesis.

embargo, no se pudo determinar qué señales pertenecían al pirrol A y cuales al B. Para poder asignar inequívocamente estas señales, y además, detectar las resonancias de los protones NH intercambiables, se realizaron los experimentos en H₂O a 5°C.

Tabla 3.1 Desplazamiento químico (± 0.01 ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento de las resonancias de los protones aromáticos y los protones de la cadena γ en el espectro de ^1H -RMN de las glico-oligoamidas (1 y 2) en D₂O a 25 °C. Referencia TSP-d₄ a 0.00ppm.

		β -D-Xil-Py- γ -Py-Ind 1	β -D-Xil-Py- γ [R(NH ₃ ⁺)]-Py-Ind 2
INDOL	Ind-4	7.81 (d, $J = 8.7$ Hz)	7.81 (d, $J = 8.6$ Hz)
	Ind-7	7.61 (d, $J = 8.7$ Hz)	7.61 (d, $J = 8.6$ Hz)
	Ind-6	7.40 (dd, $J = 8.7, 8.7$ Hz)	7.40 (dd, $J = 8.6, 8.6$ Hz)
	Ind-5	7.24 (dd, $J = 8.7, 8.7$ Hz)	7.24 (dd, $J = 8.6, 8.6$ Hz)
	Ind-3	7.22 (s)	7.21 (s)
PIRROL	Py-5 ^A	7.10 (d, $J = 2.0$ Hz)	7.11 (d, $J = 2.0$ Hz)
	Py-5 ^B	6.86(d, $J = 2.0$ Hz)	6.86(d, $J = 2.0$ Hz)
	Py-3 ^B	6.67(d, $J = 2.0$ Hz)	6.68(d, $J = 2.0$ Hz)
	Py-3 ^A	6.60(d, $J = 2.0$ Hz)	6.66(d, $J = 2.0$ Hz)
	Me ^A	3.73 (s)	3.77 (s)
	Me ^B	3.62 (s)	3.63 (s)
CADENA γ	γ^a	3.45-3.41 (m)	3.63-3.57 (m)
	$\gamma^{a'}$		
	γ^b	2.00-2.09 (m)	3.91-4.00 (m)
	γ^c	2.38-2.46 (m)	2.77 (dd, $J = 15.0, 3.7$ Hz)
	$\gamma^{c'}$		2.70 (dd, $J = 15.0, 8.8$ Hz)

Como se observa en la tabla, no hay grandes diferencias de desplazamientos químicos entre las regiones aromáticas de los espectros de ambas glico-oligoamidas. Donde más difieren, es en la región correspondiente a las señales de la cadena γ . En el espectro de la glico-oligoamida catiónica de xilosa (2), la señal correspondiente al protón γ^b aparece a 4.00 ppm y los protones γ^c son diastereotópicos, por lo que aparecen a diferente desplazamiento químico y tienen distintas constantes de acoplamiento con γ^b . Gracias a estos datos, se pudo determinar que la señal a 2.77 ppm con una constante de 3.7 Hz corresponde a γ^c que está en posición *sin* con respecto a γ^b y la señal a 2.70 ppm con una constante de 8.8 Hz corresponde a $\gamma^{c'}$, en posición *anti*

con respecto a γb . Desafortunadamente, no fue posible asignar de esta forma los protones γa y $\gamma a'$ debido al solapamiento de señales en esa zona.

La asignación de los protones del carbohidrato (Tabla 3.2) fue posible principalmente gracias al experimento COSY en D_2O a $25^\circ C$. La detección del protón anomérico se logró realizando un espectro 1H -RMN en D_2O sin supresión de agua.

Tabla 3.2 Desplazamiento químico (± 0.01 ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento de las resonancias de los protones correspondientes al carbohidrato en el espectro de 1H -RMN de las glico-oligoamidas (**1** y **2**) en D_2O a $25^\circ C$. Referencia TSP- d_4 a 0.00 ppm.

		β -D-Xil-Py- γ -Py-Ind 1	β -D-Xil-Py- γ [R(NH $_3^+$)]-Py-Ind 2
	CARBOHIDRATO		
	H1	4.70 (d, $J = 8.7$ Hz)	4.64 (d, $J = 8.9$ Hz)
	H5	3.70 (m)	3.66-3.64 (m)
	H2	3.42 (dd, $J = 8.7, 8.7$ Hz)	3.39 (dd, $J = 8.9, 8.9$ Hz)
	H3	3.38-3.34 (m)	3.30-3.37 (m)
	H4	3.35-3.34 (m)	3.30-3.37 (m)
	H5'	3.13 (dd, $J = 11.1, 11.1$ Hz)	3.09 (dd, $J = 11.1, 11.1$ Hz)

En H_2O/D_2O , se detectaron y asignaron las resonancias de los protones amídicos (NH1 a NH5) de los compuestos **1** y **2** (Tabla 3.3). Gracias a la multiplicidad de las señales, se pudieron asignar directamente NH5 y NH3. El protón NH5 se acopla con el protón anomérico del carbohidrato dando lugar a un doblete, y el NH3 se acopla con los dos protones γa , dando lugar a un triplete. Estas dos asignaciones fueron importantes para la asignación posterior de las resonancias de los pirroles A y B respectivamente. En el espectro NOESY en $90 H_2O/10 D_2O$ de la glico-oligoamida catiónica **2** se detectaron los nOes NH3/Py-3^A y NH5/Py-3^B, que permitieron asignar las resonancias de los protones de cada pirrol de manera inequívoca. La asignación del resto de los NHs de la glico-oligoamida catiónica **2** fue compleja. No se obtuvieron picos de cruce nOe para el resto de los NHs y en el caso del NH4 no se observó su señal en el espectro 1H -RMN. De este modo, la asignación del NH1 se realizó en base al desplazamiento químico y NH2 se asignó por analogía con la glico-oligoamida neutra **1**.

Tabla 3.3 Desplazamiento químico (± 0.01 ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento de las resonancias de los protones NH en el espectro de ^1H -RMN de las glico-oligoamidas (1 y 2) en H_2O a 5°C . Referencia TSP- d_4 a 0.00ppm .

		$\beta\text{-D-Xil-Py-}\gamma\text{-Py-Ind}$ 1	$\beta\text{-D-Xil-Py-}\gamma[\text{R}(\text{NH}_3^+)]\text{-Py-Ind}$ 2
PROTONES NH	NH1	10.81 (s)	10.93 (s)
	NH2	10.02 (s)	10.03 (s.a.)
	NH4	9.62 (s)	- ^a
	NH5	8.23 (d, $J = 8.5$ Hz)	8.35 (d, $J = 8.9$ Hz)
	NH3	7.72	8.16 (t, $J = 6.4$ Hz)

^a No fue posible detectar la señal de este protón en H_2O

Por último, también se asignaron las señales del modelo de hebra carbohidrato de D-xilosa 5, $\beta\text{-D-Xil-Py-NHAc}$.

Tabla 3.4 Desplazamiento químico (± 0.01 ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento de las resonancias de los protones del modelo hebra carbohidrato de D-xilosa, en el espectro de ^1H -RMN en D_2O a 25°C y H_2O a 5°C para observar los NHs. Referencia TSP- d_4 a 0.00ppm .

		$\beta\text{-D-Xil-Py-NHAc}$ 5
NH	NH4	9.81 (s)
	NH5	8.85 (d, $J = 9.0$ Hz)
PIRROL	Py-5 ^B	7.16 (d, $J = 1.9$ Hz)
	Py-3 ^B	6.84 (d, $J = 1.9$ Hz)
	Me ^B	3.82 (s)
CARBOHIDRATO	H1	5.01 (d, $J = 9.0$ Hz)
	H5	3.97 (dd, $J = 11.4, 5.6$ Hz)
	H4	3.69-3.61 (m)
	H2	3.56-3.50 (m)
	H3	3.56-3.50 (m)
	H5'	3.44 (dd, $J = 11.4, 11.4$ Hz)
	COCH ₃	2.12 (s)

3.3.2 Estudio conformacional de la glico-oligoamida catiónica de xilosa 2

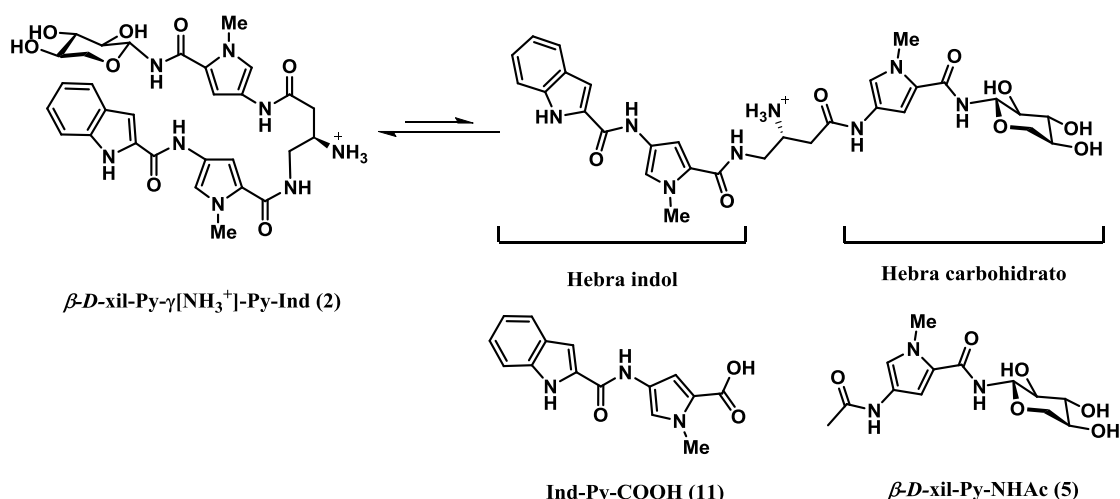
Una vez caracterizadas y asignadas las resonancias de las glico-oligoamidas neutra **1**, catiónica **2**, y el modelo hebra carbohidrato **5**, por RMN en D₂O y H₂O; se llevaron a cabo estudios estructurales por RMN orientados a determinar la existencia de un porcentaje de conformación plegada de la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2** en agua (conformación en horquilla) y la disposición del carbohidrato en dicho plegamiento. El protocolo seguido ha sido puesto a punto en nuestro laboratorio con el estudio de las glico-oligoamidas neutras. Este consta de diversos análisis de datos obtenidos en experimentos de RMN, entre los que se encuentran: estudio de los desplazamientos químicos entre la hebra carbohidrato y la glico-oligoamida, valor de la constante de acoplamiento del NH5, experimentos NOESY en D₂O y H₂O y experimentos de temperatura variable en H₂O: Acetona (90:10).

3.3.2.1 Estudio comparativo de los desplazamientos químicos de RMN de la glico-oligoamida catiónica (**2**) y de su mitad carbohidrato (**5**)

El desplazamiento químico (δ) de un núcleo en RMN es una medida de la dependencia de su frecuencia de resonancia con respecto a su entorno químico. La existencia de un equilibrio conformacional en disolución, altera el entorno químico de la molécula y perturba los desplazamientos químicos de los núcleos. Cuando una molécula presenta un equilibrio conformacional en disolución, dependiendo de la velocidad a la cual sucede el intercambio conformacional dentro de la escala de tiempos del desplazamiento químico de RMN, se pueden dar dos situaciones diferentes. Si el intercambio conformacional es rápido, el desplazamiento químico de las señales de resonancia del espectro de ¹H-RMN observado es un promedio de los desplazamientos químicos de las conformaciones en equilibrio. Por el contrario, si el equilibrio es lento, el espectro de ¹H-RMN se caracteriza por la presencia de más de una señal para cada protón, que pertenecen a cada una de las conformaciones que existen en el equilibrio.

Haciendo uso de esta propiedad, una de las estrategias empleadas en nuestro grupo para realizar los estudios de plegamiento de las glico-oligoamidas, consiste en comparar los desplazamientos químicos de las resonancias de la molécula con los de sus modelos de conformación abierta y calcular la diferencia de desplazamiento químico ($\Delta\delta$) existente entre ambos.

En los espectros de ¹H-RMN en D₂O de la glico-oligoamida catiónica de xilosa (**2**) no se observó desdoblamiento de señales en ninguna de las resonancias. Esto quiere decir que si existe un equilibrio conformacional en disolución, éste es rápido en la escala de tiempos de los desplazamientos químicos. Es decir, los valores de desplazamientos químicos observados están promediados entre los desplazamientos químicos característicos de cada conformación y dependen de la población de cada conformero presente en disolución. El modelo hebra carbohidrato de D-xilosa **5** (β -D-Xil-Py-NHAc) podría considerarse como un modelo del fragmento azúcar-pirrol de la conformación abierta de la glico-oligoamida catiónica **2** (Esquema 3.1).



Esquema 3.1 Equilibrio conformacional entre la forma plegada y la forma abierta de la glico-oligoamida catiónica de xilosa β -D-Xil-Py- γ [NH₃⁺]-Py-Ind (2) en H₂O y sus correspondientes modelos de cadena abierta Ind-Py-COOH (11) y β -D-Xil-Py-NHAc (5)

La presencia de un porcentaje importante de conformación plegada en disolución debería reflejarse en una diferencia de desplazamiento químico notable entre las resonancias de la glico-oligoamida y las resonancias del modelo de conformación abierta. Por ello, y como primera aproximación al estudio conformacional, se ha realizado este estudio comparativo. Se registraron espectros de ¹H-RMN en D₂O y H₂O/D₂O de los compuestos **2** y **5** en las mismas condiciones de concentración (350 μ M) y temperatura (25°C y 5°C). La comparación de los desplazamientos químicos de la glico-oligoamida catiónica con su correspondiente modelo de hebra carbohidrato, mostró la existencia de desplazamientos químicos inducidos significativos (Tabla 3.5 y Tabla 3.6).

Tabla 3.5 Diferencia de desplazamientos químicos de los protones correspondientes al carbohidrato entre el modelo de carbohidrato **5** y la glico-oligoamida catiónica **2** ($\Delta\delta = \delta_{\beta\text{-D-Xyl-Py-NHAc}} - \delta_{\beta\text{-D-Xyl-Py-}\gamma\text{-(R)NH}_3^+\text{-Py-Ind}}$)

		$\Delta\delta$ (ppm)
CARBOHIDRATO	H1	0,37
	H2	0,15
	H3	0,22
	H4	0,32
	H5	0,32
	H5'	0,35

Tabla 3.6 Diferencia de desplazamientos químicos del pirrol B entre el modelo de carbohidrato 5 y la glico-oligoamida catiónica 2 ($\Delta\delta = \delta_{\beta\text{-D-Xyl-Py-NHAc}} - \delta_{\beta\text{-D-Xil-Py-}\mu\text{(R)NH3}^+\text{-l-Py-Ind}}$)

		$\Delta\delta$ (ppm)
PIRROL	Py-5 ^B	0.29
	Py-3 ^B	0.18
	Me ^B	0.19
	NH5	0.5
	NH4	-- ^a

^a No fue posible detectar la señal de este protón en H₂O en la glico-oligoamida catiónica 2

En general, todos los protones correspondientes a la hebra carbohidrato sufrieron el apantallamiento de sus señales en mayor o menor medida. Estos resultados están de acuerdo con la presencia de un porcentaje de conformación plegada en la glico-oligoamida catiónica de xilosa 2. Las variaciones en los desplazamientos químicos más significativas se encuentran en algunos protones del carbohidrato, llegando a apantallamientos por encima de 0.3 ppm en algunas señales (Figura 3.9). Este apantallamiento de las resonancias del carbohidrato estaría originado por la proximidad de éste al indol en la conformación plegada en forma de horquilla. Los protones del carbohidrato, apuntarían directamente hacia el cono de apantallamiento del indol, generándose un desplazamiento de la señales más acusado.

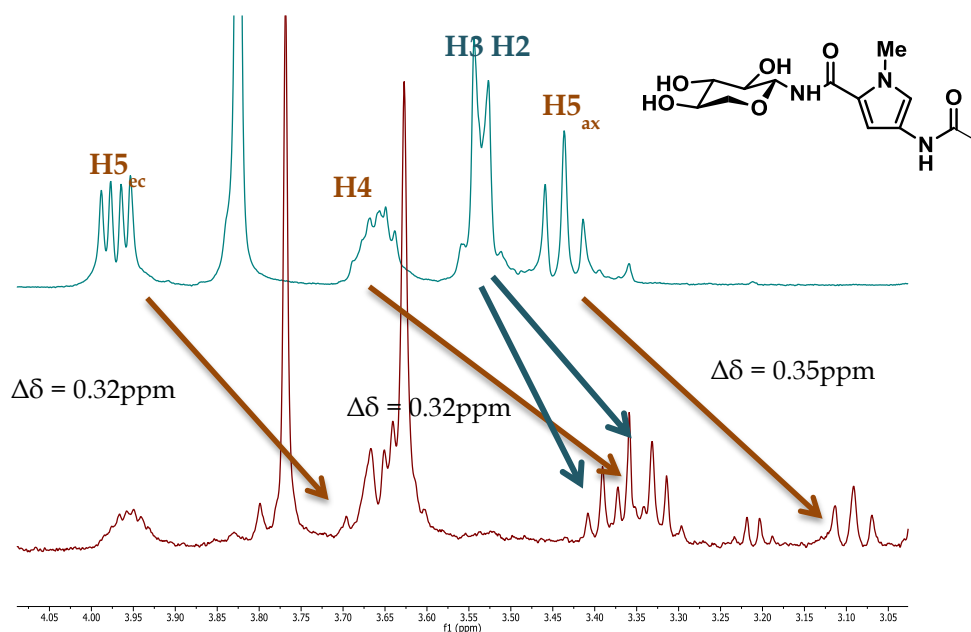


Figura 3.9 Comparación de las regiones del carbohidrato de los espectros de ¹H-RMN de la glico-oligoamida catiónica 2 (espectro rojo) y su modelo hebra carbohidrato 5 (espectro azul) en D₂O a 25°C

En cuanto al pirrol, el apantallamiento de sus resonancias es menos acusado pero significativo (Tabla 3.6). En una conformación plegada, los pirroles quedarían enfrentados en paralelo, por lo tanto sus protones apuntarían hacia el exterior del cono de apantallamiento del otro pirrol. Por último, el protón NH5 de la glicosil-amida experimentó la mayor modificación en cuanto a su desplazamiento químico, se apantalló 0.5 ppm. Todos estos datos estarían de acuerdo con la proximidad de las dos hebras en la conformación plegada.

Con estos resultados, se puede realizar una comparación entre la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2**, con los resultados obtenidos previamente para la glico-oligoamida neutra de xilosa **1**.¹¹ La siguiente Figura 3.10, muestra como ambas moléculas (**1** y **2**) siguen la misma tendencia de apantallamiento en las señales del carbohidrato. Para ambas, los protones que sufren mayor perturbación son H5' (posición axial) y H1, seguidos de H5 (posición ecuatorial) y H4. Los menos afectados en ambos casos son H2 y H3. No obstante, a pesar de la tendencia general común para ambos compuestos, la glico-oligoamida catiónica **2**, presenta apantallamientos superiores a los observados en la glico-oligoamida neutra. Esto podría indicar una mayor definición de la horquilla en la conformación plegada de la glico-oligoamida catiónica.

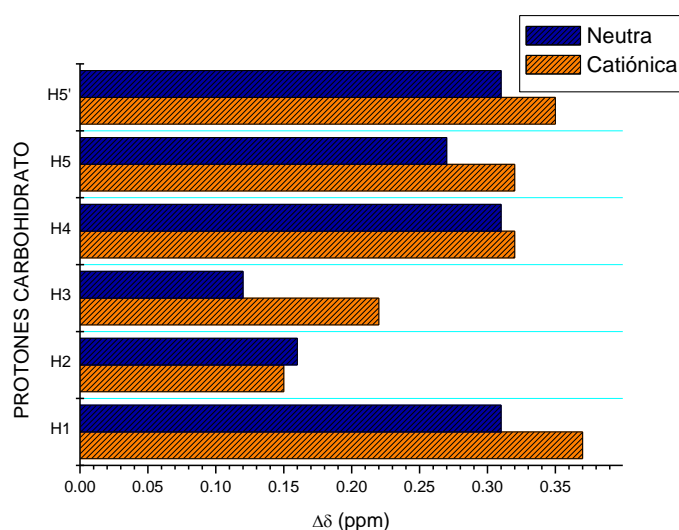


Figura 3.10 Gráfica comparativa de las diferencias de desplazamientos químicos inducidos ($\Delta\delta$) de β -D-Xil-Py- γ -(R)NH₃⁺]-Py-Ind (naranja) y β -D-Xil-Py- γ -Py-Ind (azul) con respecto al modelo β -D-xyl-Py-NHAc

3.3.2.2 Caracterización de la conformación plegada de β -D-Xil-Py- γ -(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**)

Un experimento muy eficaz de RMN a la hora de determinar la estructura tridimensional de una molécula en disolución es el NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy), en el cual se transfiere la magnetización de spin a spin a través del espacio, gracias a un fenómeno de interacción dipolo-dipolo denominado

¹¹ Muñoz-Valentín, E.M. Una aproximación al estudio de la interacción carbohidrato-ADN. Tesis doctoral, Universidad de Valladolid, España, 2003.

relajación cruzada. Estos experimentos NOESY, en conjunto con experimentos ROESY (Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy), pueden dar información estructural muy valiosa de una molécula en disolución. Estos estudios han sido empleados anteriormente en nuestro grupo de investigación, obteniéndose de ellos la información necesaria como para poder describir la conformación plegada en forma de horquilla de las glico-oligoamidas neutras. La estructura de estas moléculas está definida por dos hebras distintas: la hebra carbohidrato y la hebra indol.¹² La observación de una serie de nOes característicos, intra-hebra e inter-hebra, es crucial para poder determinar dicha conformación. La existencia de estos nOes inter-hebra entre las unidades aromáticas, que se encuentran enfrentadas en la conformación en horquilla, nos permitirá definir el plegamiento de las glico-oligoamidas catiónicas y poder contrastar la conformación obtenida con la de su análoga neutra.

El objetivo de este apartado era la obtención de una serie de espectros NOESY y ROESY en D₂O y en H₂O/D₂O (90:10) a 5°C, para poder caracterizar el plegamiento de las glico-oligoamida catiónica de xilosa **2** y la orientación del carbohidrato en dicho plegamiento. Desafortunadamente, no se obtuvieron espectros con nOes claros que permitieran describir una conformación mayoritaria en disolución. Por este motivo, no se consiguió definir con detalle la orientación del carbohidrato con respecto al resto de la molécula, es decir, la proximidad de una cara concreta del carbohidrato al indol.

No obstante, en el análisis del espectro ROESY en H₂O, sí que se logró observar algunos nOes intra-hebra característicos de la forma arqueada que presentan las glico-oligoamidas neutras. Se trata de nOes entre los protones amídicos (NH3 y NH5) y los protones en posición 3 de los anillos de pirrol A y B respectivamente (Figura 3.11). Esta conformación arqueada tendría un arco interior delimitado por los grupos NH presentes en la estructura y otro arco exterior, delimitado por los grupos Me de los pirroles (Figura 3.13).

¹² Ver apéndice de nomenclatura para aclaración.

⁷ Martín, J. N.; Muñoz, E. M.; Schwergold, C.; Souard, F.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Cañada, J.; Vicent, C. J. *Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9518-9533.

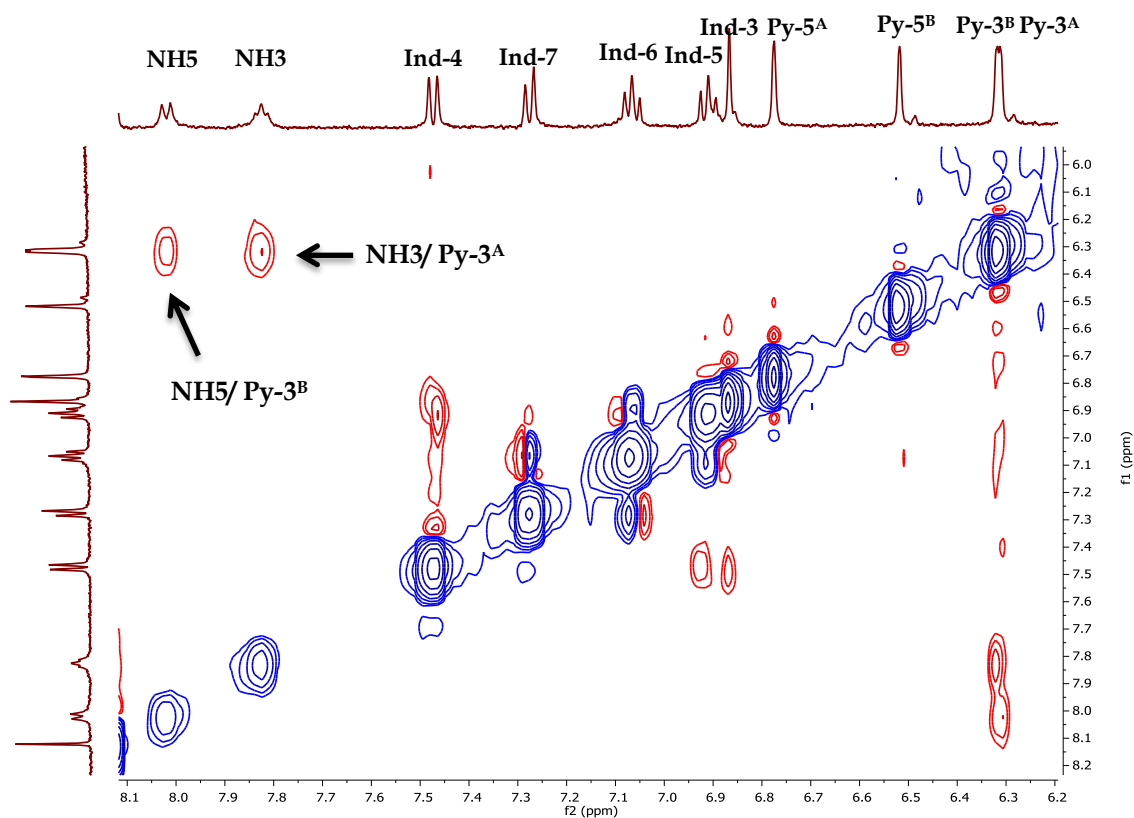


Figura 3.11 Ampliación del espectro ROESY de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) en H₂O con capilar de D₂O a 5 °C

Además, en el espectro ROESY realizado en D₂O, también se observaron nOes claros inter-hebra entre unidades de pirrol de tipo Py-5^A/Me^B y Py-5^B/Me^A (Figura 3.12).

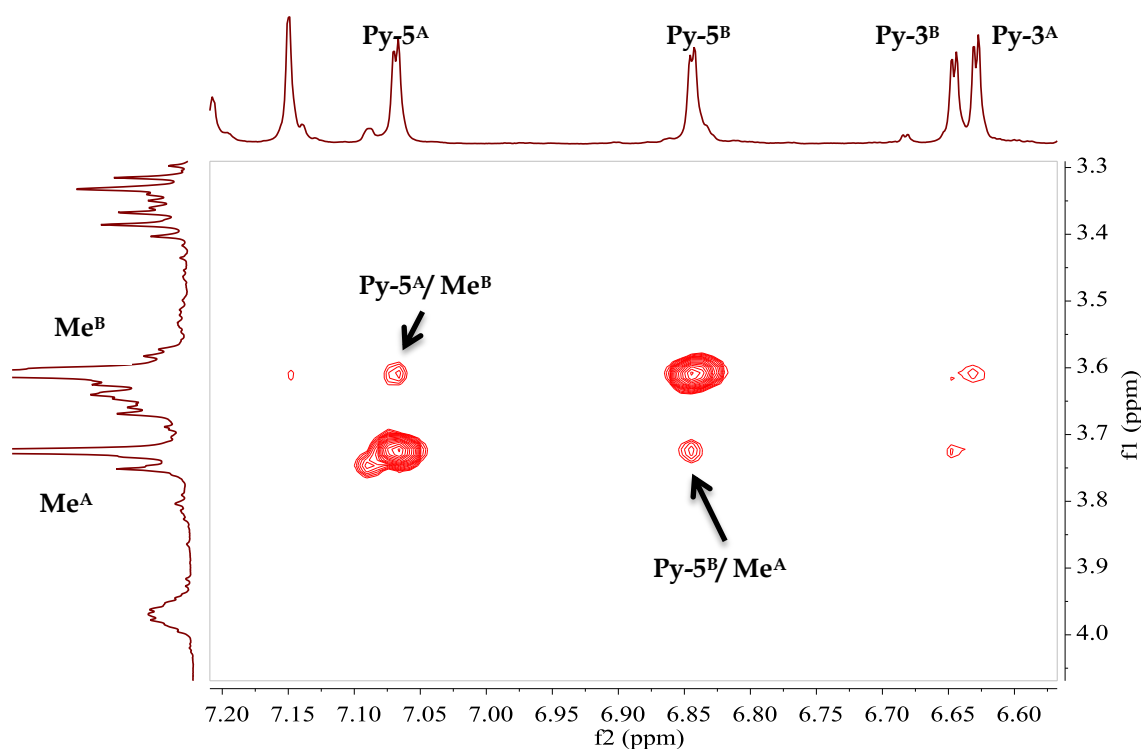


Figura 3.12 Ampliación del espectro ROESY de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) en D₂O a 25 °C

De esta forma, se confirma la presencia de un porcentaje de conformación plegada tipo horquilla en la glico-oligoamida catiónica β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2). La observación de estos nOes estaría acorde con el análisis previo de los desplazamientos químicos inducidos debidos al acercamiento sobre el residuo de xilosa, confirmándose el plegamiento de la glico-oligoamida catiónica, en el cual ambos pirroles se encontrarían enfrentados (Figura 3.13).

La conformación de las glico-oligoamidas catiónicas en disolución acuosa sería, por tanto, análoga a la descrita con anterioridad para las glico-oligoamidas neutras y la conformación bioactiva hallada en las oligoamidas de Dervan en el estado asociado.¹³

¹³ Geierstanger, B.H.; Mrksich, M.; Dervan, P.B.; Wemmer, D.E. *Nature Structural Biology* 1996, 3, 321-324.

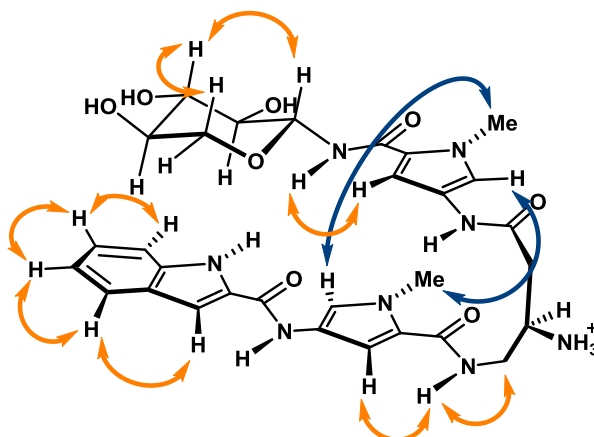


Figura 3.13 Representación esquemática de los nOes encontrados en los espectros ROESY en D_2O a $25\text{ }^{\circ}C$ y en H_2O con capilar de D_2O a $5\text{ }^{\circ}C$. En azul los nOes inter-hebra y en naranja los nOes intra-hebra.

La determinación de la conformación del enlace amido-glicosídico, puede dar información sobre la disposición espacial y orientación del carbohidrato con respecto al resto de la molécula. Una consecuencia importante del carácter parcial de doble enlace de la unión C-N de las amidas es la existencia de los isómeros *E* y *Z* debidos a la rotación impedida en torno a dicho enlace. La existencia de estos isómeros rotacionales se ha establecido mediante estudios de espectroscopia Raman, espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear y medidas de momento dipolar. Además, en función del ángulo de torsión (ϕ) del enlace H1-C1-N5-H5, se puede hablar de una conformación *syn* o *anti*. Existen, por tanto, cuatro posibilidades conformacionales diferentes, que se muestran a continuación, para el enlace amida (Figura 3.14).

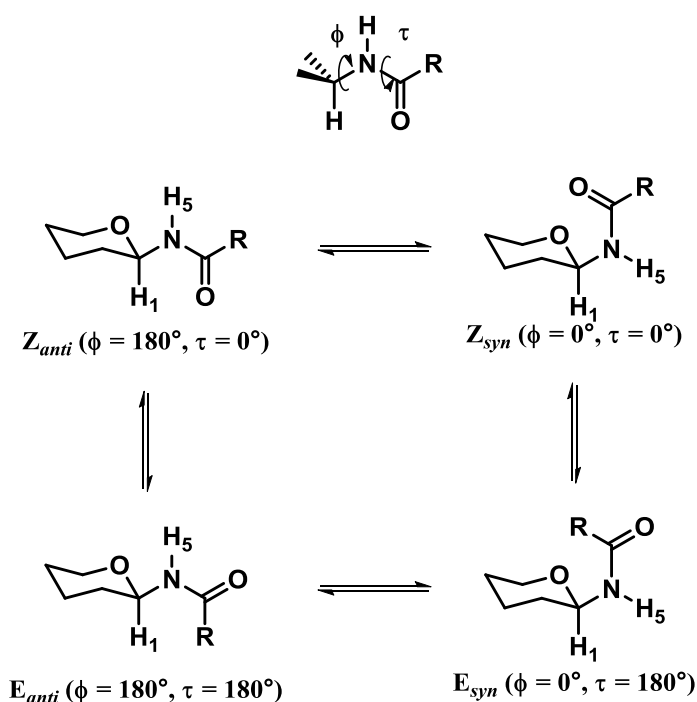


Figura 3.14 Conformaciones *syn* y *anti* de los isómeros *Z* y *E* de las glicosilamidas

Estudios de RMN, rayos X y cálculos semiempíricos han demostrado que, en general, las glicosilamidas existen preferentemente en una conformación *Z anti* en torno al enlace amido-glicosídico.¹⁴ Así, por ejemplo, aplicando la herramienta “*glytortion*” dentro de la web Glycosciences,¹⁵ se encuentra que en las estructuras descritas para el enlace glicosil-amida en *N*-glicanos (GlcNAc-Asn) las conformaciones cercanas a la disposición *Z-anti* son las más pobladas. En el caso de la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2**, gracias a la existencia del nOe NH5/Py-3^B se ha podido definir la configuración *Z* del enlace amida (Figura 3.13).

Otro dato adicional que nos puede dar información sobre este enlace es la constante de acoplamiento del protón NH5 con el protón anomérico del carbohidrato H1 ($J_{\text{NH5-H1}}$), que está relacionada con el ángulo diedro (ϕ). Esta constante de acoplamiento observada en β -D-Xil-Py- γ [(*R*)NH₃⁺]-Py-Ind es de 8.9 Hz. Desafortunadamente, la ecuación de Karplus no permite distinguir inequívocamente las disposiciones definidas por $\phi \sim 0^\circ$ ($J_{\text{H-NH}} \sim 10$ Hz) y $\phi \sim 180^\circ$ ($J_{\text{H-NH}} \sim 12$ Hz).¹⁶ La diferenciación entre ambas conformaciones sería posible mediante la observación de algún nOe NH5/H-1 ó NH5/H-2. En la conformación *syn*, los protones H1 y NH5 se encuentran próximos en el espacio, mientras que H2 queda opuesto a NH5. Por el contrario, en la conformación *anti*, es H2 el que queda próximo al protón amídico. Sin embargo, no fue posible la detección de ningún nOe que permitiese la definición de la conformación del enlace *Z* amido-glicosídico. Resultados previos de nuestro grupo de investigación, obtenidos para las glico-oligoamidas neutras, sí fueron concluyentes. Estos indicaron que el enlace amidoglicosídico se encontraba en una conformación preferente *Z anti*, al igual que en otras glicosil-amidas descritas en la bibliografía.

En base a estos precedentes, y viendo la similitud existente entre la conformación de las glico-oligoamidas neutras y las catiónicas en el estado libre, se podría asumir que posiblemente la conformación preferente del enlace amidoglicosídico del derivado catiónico de xilosa **2** es *Z anti*.

3.3.2.3 Experimentos de temperatura variable en H₂O: acetona (90:10) de la glico-oligoamida catiónica **2**.

Con objeto de lograr una mayor información estructural del plegamiento de la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2**, se realizó un estudio del efecto de la temperatura en los desplazamientos químicos de ¹H-RMN en H₂O. Este método se emplea con frecuencia en el estudio de plegamiento de péptidos, y su análisis ha logrado obtener en algunos casos la estimación de la población de conformación

¹⁴ (a) Avalos, M.; Babiano, R.; Carretero, M. J.; Cintas, P.; Higes, F. J.; Jiménez, J.; Palacios, J. C. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 615-628. (b) Avalos, M.; Babiano, R.; Barneto, J. L.; Bravo, J. L.; Cintas, P.; Jiménez, J. L.; Palacios, J. C. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7275-7282.

¹⁵ Lütteke, T.; Frank, M.; von der Lieth, C. W. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, D242-D246. <http://www.glycosciences.de>.

¹⁶ Bystrov, V. F.; Portnova, S. L.; Tsetlin, V. I.; Ivanov V. I.; Ovchinnikov, Y. A. *Tetrahedron* **1975**, *31*, 2177-2209.

plegada en disolución.¹⁷ En nuestro grupo de investigación, se ha aplicado con anterioridad al estudio del plegamiento de las glico-oligoamidas neutras.¹⁸

Los experimentos se realizaron en H₂O cubriendo un rango de temperatura entre -15 °C y 0 °C. Se trabajó a temperaturas bajas con la intención de detectar las resonancias de los protones intercambiables (NH y OH). Para poder bajar la temperatura por debajo de 0 °C, se tuvo que usar un pequeño porcentaje de acetona-*d*₆ (90:10) para evitar la congelación de la muestra. También se realizó el mismo experimento con el modelo hebra carbohidrato de xilosa **5** (β-D-Xil-Py-NHAc), con objeto de comparar el comportamiento de ambas moléculas bajo el efecto de la variación de temperatura.

Debido a que estos experimentos se realizaron en condiciones, de temperatura y disolvente, diferentes a las anteriormente empleadas, fue necesario realizar una asignación previa en H₂O: acetona-*d*₆ (90:10) a -15 °C de los compuestos **2** y **5**. La detección y asignación de las resonancias de los protones hidroxilo y amídicos intercambiables se realizó mediante espectros de RMN TOCSY (60 ms) y NOESY (400ms) en esas mismas condiciones. Las tablas con estas asignaciones se muestran en el anexo del capítulo 4.

En primer lugar cabe destacar que, mientras en los espectros de ¹H-RMN de β-D-Xil-Py-γ[(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) se aprecia movimiento de señales en función de la temperatura (Figura 3.15), en el caso de β-D-Xil-Py-NHAc (**5**) no se observa tal desplazamiento (Figura 3.16). Esta diferencia de comportamiento sugiere la existencia de un equilibrio conformacional en el caso de la glico-oligoamida catiónica **2**, sensible a la temperatura que no tiene lugar en el modelo **5**. En segundo lugar, si se realiza la misma comparación de desplazamientos químicos entre los espectros de ¹H-RMN de β-D-Xil-Py-γ[(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) y β-D-Xil-Py-NHAc (**5**), que se hizo en el apartado 3.3.2.1, pero ahora a -15 °C, se obtienen los mismos resultados. Las señales del carbohidrato correspondientes a H1, H5, H5' y H4 se apantallan en mayor medida, mientras que las variaciones en H2 y H3 son menores (Gráfica de la Figura 1 del anexo del capítulo).

¹⁷ Honda, S.; Kobayashi, N.; Muneata, E. *J. Mol. Biol.* **2000**, 295, 269-278.

¹⁸ (a) Muñoz-Valentín, E.M. Una aproximación al estudio de la interacción carbohidrato-ADN. Tesis doctoral, Universidad de Valladolid, España, 2003. (b) Blázquez-Sánchez, M. T.; Marcelo, F.; Fernández-Alonso, M. C.; Poveda, A.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 17640-17652.

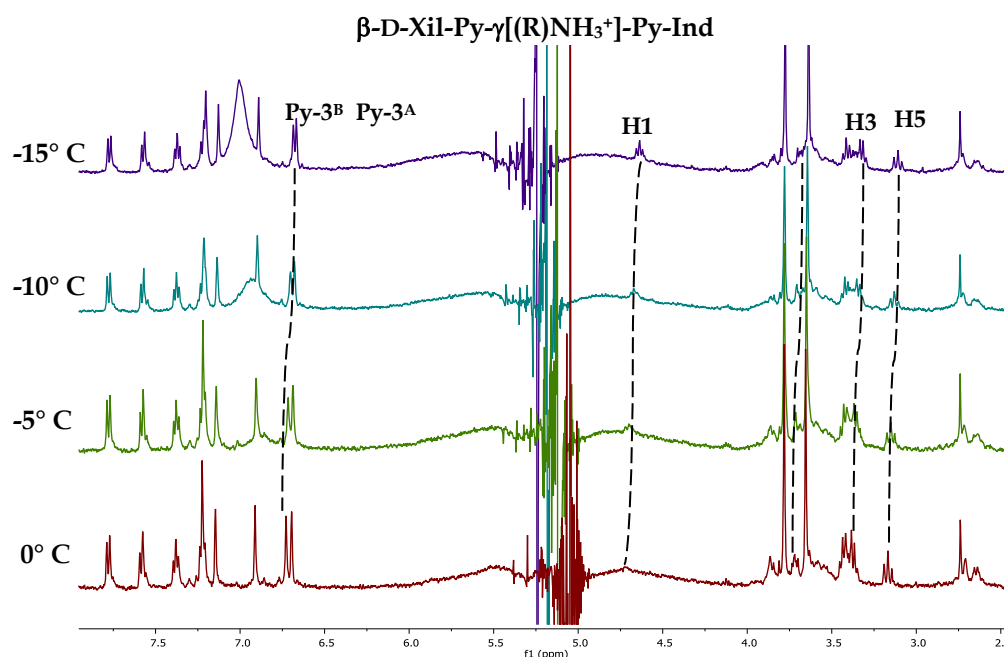


Figura 3.15 Espectros de ¹H-RMN de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind en H₂O/acetona-d₆ en el rango de 0°C a -15 °C

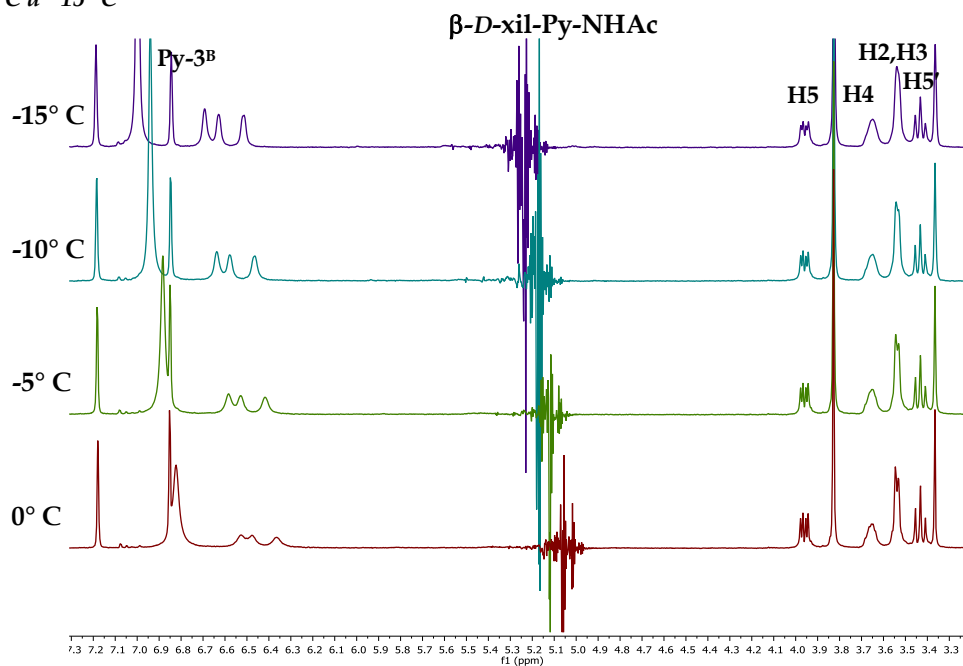


Figura 3.16 Espectros de ¹H-RMN de β -D-Xil-Py-NHAc en H₂O:acetona-d₆ en el rango de 0°C a -15 °C

En general, las variaciones de los desplazamientos químicos de las resonancias de los protones de la glico-oligoamida catiónica (**2**) con la temperatura son pequeñas y prácticamente todas se desplazan a campo alto. Sólo la señal correspondiente al protón γ_b muestra un comportamiento opuesto, desapantallándose 0.04 ppm. En el anexo del capítulo 4 se muestran las tablas con las distintas variaciones para cada señal. Las señales correspondientes al indol casi no sufren perturbación, al igual que las señales correspondientes a los protones Py-5^A y Py-5^B (variaciones de 0.01 y 0.02 ppm). Por el

contrario, las señales de los protones Py-3^A y Py-3^B varían 0.05 y 0.04 respectivamente. En cuanto a los protones del carbohidrato, siguen un patrón de apantallamiento similar al encontrado en la comparación del modelo y la horquilla, tanto a 25 °C como a -15 °C. Como se puede ver en la Figura 3.17, la señal que mayor perturbación sufre es el H1 anomérico ($\Delta\delta = 0.1$ ppm), seguido de H5, H5' y H3. Sin embargo, las señales de H4 y H2 acusan una menor variación en su desplazamiento químico. No obstante, no son diferencias muy significativas.

Los datos obtenidos de los experimentos de temperatura variable corroboran, por tanto, la existencia en disolución un porcentaje de conformación plegada para la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2**. Además, se observa un patrón reproducible de apantallamiento de señales concretas del carbohidrato que está en concordancia con lo observado en los experimentos de comparación de la glico-oligoamida catiónica **2** con su modelo hebra carbohidrato **5**. Sin embargo, ni las variaciones de los desplazamientos químicos inducidos, ni los resultados extraídos de los experimentos de temperatura variable permiten definir una orientación concreta del carbohidrato hacia el indol. Es decir, no hay una preferencia conformacional por una única cara del carbohidrato, probablemente exista una mezcla conformacional en disolución.

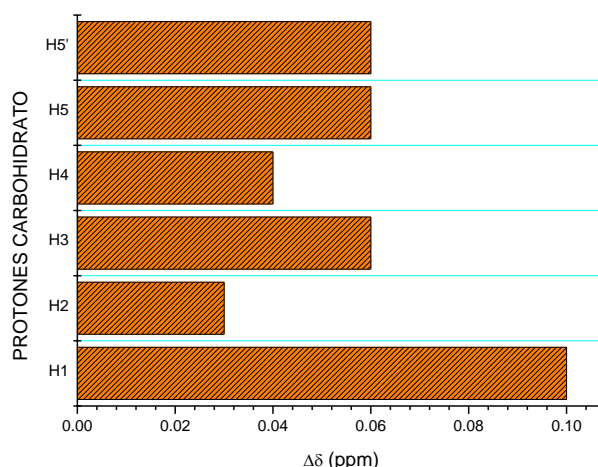


Figura 3.17 Gráfica con las variaciones de desplazamientos químicos ($\Delta\delta$) en función de la temperatura de los protones correspondientes al carbohidrato de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**).

3.3.3 Conclusiones del estudio conformacional en agua de la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2**.

Los desplazamientos químicos inducidos ($\Delta\delta$) de los experimentos comparativos de ¹H-RMN en D₂O de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) con su modelo hebra carbohidrato **5** (β -D-Xil-Py-NHAc), y los experimentos de ¹H-RMN de temperatura variable, muestran un patrón de apantallamiento de señales indicativo de la presencia de un porcentaje de conformación plegada en forma de horquilla. Los nOes inter-hebra Py/Py confirman dicha conformación. Además, se han detectado nOes intra-hebra que han permitido ratificar la forma arqueada típica de las glico-oligoamidas,

delimitándose en la molécula dos arcos: uno exterior, marcado por los metilos de los pirroles y otro interior, definido por los NH (Figura 3.18). Al mismo tiempo, uno de estos nOes (NH5/Py-3^B) ha permitido concluir que la conformación del enlace amido glicosídico es Z.

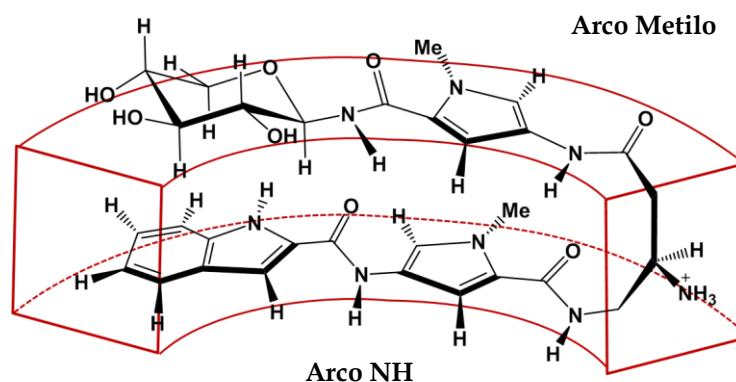


Figura 3.18 Representación de los arcos definidos por los grupos metilo y NH en β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2)

En cuanto a la orientación del carbohidrato, la imposibilidad de detectar nOes clave carbohidrato/indol, junto con el apantallamiento generalizado de varias de las señales del carbohidrato independientemente de la cara en la que se encuentran, lleva a pensar que, en el caso de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2), pueden existir varias poblaciones conformacionales en el equilibrio, siendo complejo definir una mayoritaria. En principio, la selección de una cara concreta del carbohidrato hacia el indol podría tener su origen en las interacciones que se pueden dar entre el carbohidrato y el indol. Al realizar un balance de posibles interacciones favorables o desfavorables que pueden existir con cada una de las caras de la xilosa se observa que, en principio, ambas caras podrían estar igual de favorecidas (Figura 3.19).

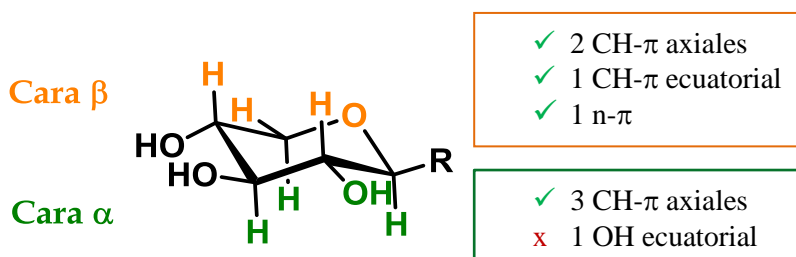


Figura 3.19 Posibles interacciones con cada una de las caras de la D-xilosa

Si se centra la atención en una posible aproximación del indol por la cara β , esta implicaría dos interacciones CH- π axiales, una ecuatorial y la participación del oxígeno del anillo de piranosa en un enlace n- π . Esta última interacción no resultaría tan estabilizante como una interacción CH- π .¹⁹ En la cara α hay tres protones en posición axial que podrían dar lugar a tres interacciones CH- π . Sin embargo, también se encuentra el OH2 en posición ecuatorial que generaría una perturbación

¹⁹ Santana, A. G.; Jiménez-Moreno, E.; Gómez, A. M.; Corzana, F.; González, C.; Jiménez-Oses, G.; Jiménez-Barbero, J.; Asensio, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 3347.

desestabilizante en la aproximación del indol por esa cara del carbohidrato. En este análisis no se observa que pueda estar favorecida una orientación determinada del carbohidrato hacia el indol, respaldándose así la hipótesis de una posible mezcla conformacional en disolución acuosa.

En la comparación con su glico-oligoamida análoga neutra **1**, se observa similitud en la conformación plegada en horquilla y en la forma arqueada, típica de oligoamidas heteroarómicas, donde también se definen los dos arcos. Además, en el caso de la glico-oligoamida neutra, se detectaron nOes débiles inter-hebra carbohidrato/indol: H2/Ind-4, H2/Ind-5 y H5'/Ind-7. Debido a estos resultados, en ese momento, se concluyó que había una cercanía espacial entre la cara β de la D-xilosa y el indol. No obstante, la realización de nuevos espectros bidimensionales (NOESY y ROESY) en el transcurso de esta tesis y el análisis de los desplazamientos químicos inducidos de la glico-oligoamida neutra **1**, parecen indicar también, la existencia de una mezcla conformacional, sin una definición clara de una conformación mayoritaria en disolución acuosa.

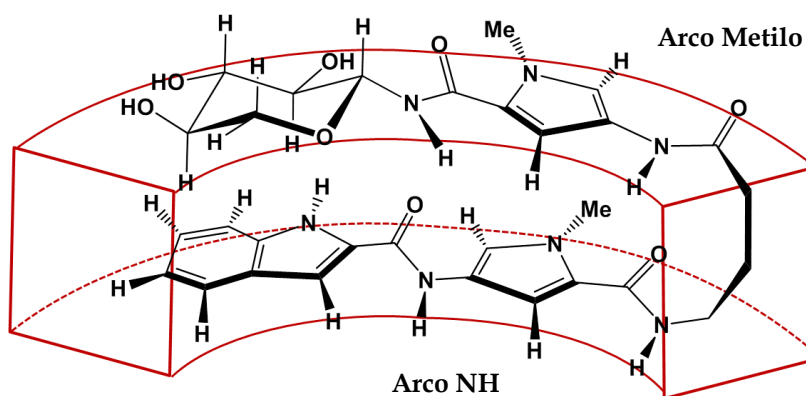


Figura 3.20 Representación de los arcos definidos por los grupos metilo y NH en β -D-Xil-Py- γ -Py-Ind (**1**) y orientación de la cara β del carbohidrato hacia el indol

3.4 Experimentos de interacción con polímeros de ADN mediante RMN

El paso siguiente al estudio conformacional de la glico-oligoamida catiónica de D-xilosa, en disolución acuosa, fue explorar su capacidad de unión al ADN. El primer objetivo planteado fue saber si la introducción del grupo amino en la posición 3 del fragmento γ promovería una mejora de afinidad en las glico-oligoamidas catiónicas respecto de sus análogas neutras. Además, era importante evaluar si la introducción de un grupo funcional con una carga positiva influiría en la especificidad de secuencia de bases, disminuyéndose la preferencia observada en las glico-oligoamidas neutras por secuencias AT. Por último, se propuso el obtener información estructural de los complejos ligando/ADN, con intención de saber cuál es la implicación del carbohidrato en los procesos de reconocimiento molecular con ácidos nucleicos.

La evolución y avance técnico de la resonancia magnética nuclear, en las últimas décadas, ha promovido el desarrollo de numerosas técnicas basadas en RMN

orientadas al estudio, a nivel atómico, de procesos de reconocimiento molecular. Dichas estrategias no sólo han supuesto un avance clave en el campo de la investigación, sino que además son empleadas en el ámbito empresarial farmacéutico.²⁰ Esta metodología permite elucidar las características estructurales tanto del ligando como del receptor, conocer qué regiones de ambas entidades participan en la interacción e incluso saber cuáles son sus conformaciones bioactivas. Además, se puede obtener información sobre las características dinámicas y termodinámicas asociadas al proceso.

En general, existen dos aproximaciones para evaluar la formación de complejos supramoleculares: métodos basados en la observación del receptor y métodos basados en la observación del ligando.²¹ La primera se centra en la monitorización y comparación de las señales asociadas al receptor, en presencia y ausencia de los posibles ligandos. De esta forma se identifican los núcleos de la macromolécula que sufren perturbaciones y el sitio de unión puede ser definido. En la segunda opción, se realiza el seguimiento de las variaciones de parámetros de RMN del ligando, especialmente los cambios que se producen al pasar del estado libre al asociado. Ambas aproximaciones son complementarias y tienen rangos de aplicación diferentes. No obstante, a lo largo de esta tesis, todos los experimentos empleados para la obtención de información estructural del sistema glico-oligoamidas catiónica-ADN están basados en la observación de las señales del ligando.

3.4.1 Estudios de interacción de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) con polímeros de ADN

El uso de polímeros de ADN como punto de partida para explorar la capacidad de unión de las glico-oligoamidas neutras ha sido fundamental para obtener tanto información estructural como para definir la selectividad y el modo de unión de estos ligandos. Estos polímeros de ADN pueden tener secuencias aleatorias (*ct*-ADN) o bien definidas, (Poly(dA-dT)₂, Poly(dG-dC)₂), confiriendo a cada polímero unas características estructurales diferentes. Además, contienen un elevado número de pares bases que generan una estructura helicoidal estabilizada, evitando así problemas de desnaturalización de la doble hélice. Teniendo en cuenta la experiencia previa en el grupo con esto polímeros de ADN y las ventajas que proporciona su uso en una primera aproximación, se optó por emplearlos en los estudios de interacción de las glico-oligoamidas catiónicas.

Estos polímeros de ADN tienen un elevado peso molecular y, por tanto, son clasificados como macromoléculas. Las macromoléculas poseen propiedades físicas características que las diferencian de moléculas mucho más pequeñas. La difusión translacional y rotacional de una molécula grande es mucho más lenta y por tanto los

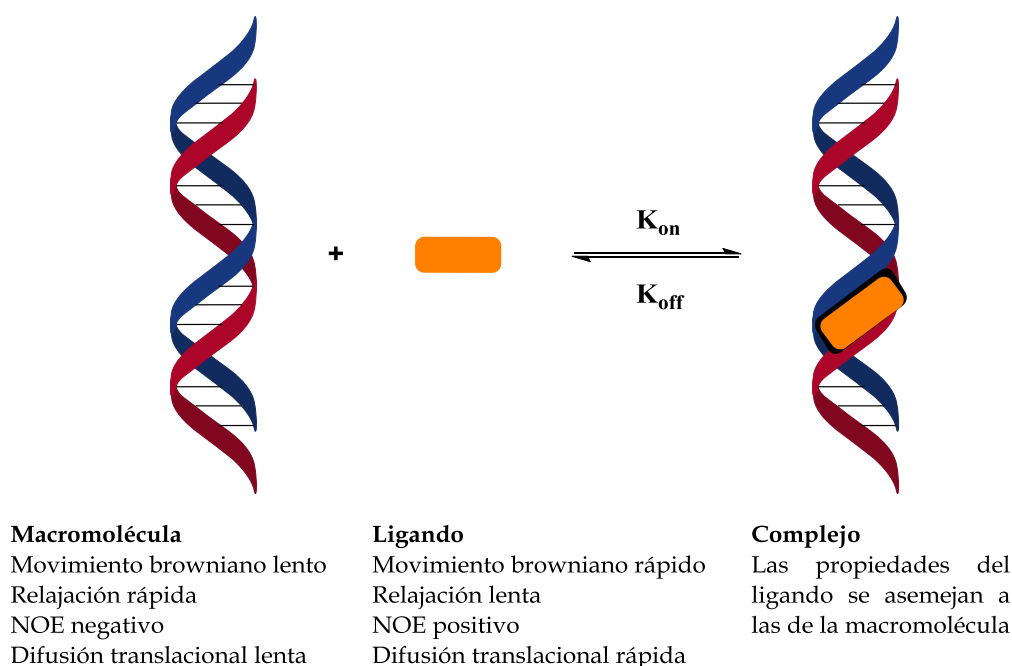
²⁰ (a) Pellecchia, M.; Bertini, I.; Cowburn, D.; Dalvit, C.; Giralt, E.; Jahnke, W.; James, T. L.; Homans, S. W.; Kessler, H.; Luchinat, C.; Meyer, B.; Oschkinat, H.; Peng, J.; Schwalbe, H.; Siegal, G. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, 7, 738-745. (b) Fernández-Alonso, M. d. C.; Díaz, D.; Berbis, M. Á.; Marcelo, F.; Cañada, J.; Jiménez-Barbero, J. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2012**, 13, 816-830.

²¹ Peng, J. W.; Moore, J. M.; Abdul-Manan, N. *Prog. Nucl. Mag. Reson. Spectrosc.* **2004**, 44, 225-256.

parámetros de RMN que dependen del tiempo de correlación molecular, como la relajación dipolar, son muy diferentes de las de una molécula orgánica pequeña. Esto supone una ventaja a la hora de estudiar este tipo de sistemas por RMN, siendo posible distinguir entre ligandos libres y asociados a macromoléculas. Los experimentos de RMN orientados al estudio de estos sistemas se basan en la observación de las diferencias en las velocidades de relajación transversal ($R_2=1/T_2$) y longitudinal ($R_1=1/T_1$), en efectos nOe y en transferencia de saturación entre ligando y macromolécula.²²

Las moléculas pequeñas se caracterizan por tener tiempos de relajación transversal largos (T_2) y por tanto, anchuras de líneas pequeñas (1-5 Hz), nOes de baja intensidad ($T_1 \approx T_2$), picos de cruce en el espectro 2D-NOESY positivos (distinto signo que la diagonal) o ligeramente negativos, tiempos de correlación cortos (ps) y coeficientes de difusión elevados. Por el contrario, las macromoléculas de peso molecular alto, como proteínas y ácidos nucleicos, se caracterizan por tener tiempos de relajación transversal cortos (T_2) y por ello, señales de resonancia muy ensanchadas, alta eficiencia de transferencia de nOe ($T_1 \gg T_2$), picos de cruce en el espectro 2D-NOESY negativos (mismo signo que la diagonal), tiempos de correlación largos (varios ns) y coeficientes de difusión traslacional pequeños.

Cuando una molécula pequeña (ligando) se asocia a una macromolécula, el ligando adquiere las propiedades dinámicas de la macromolécula y, por consiguiente, sus parámetros de RMN se alteran, pareciéndose a los de esta. La monitorización de los cambios en los valores de las anchuras de línea, velocidades de relajación y nOes se puede utilizar para caracterizar y cuantificar la unión de moléculas pequeñas a macromoléculas (Figura 3.21).



²² Unione, L.; Galante, S.; Diaz, D.; Canada, F. J.; Jimenez-Barbero, J. *MedChemComm* **2014**, 5, 1280-1289.

Figura 3.21 Esquema representativo de las propiedades de RMN de moléculas pequeñas y de receptores macromoleculares

En este punto es necesario definir la escala de tiempos en la cual se ubican los eventos de los distintos parámetros observables de RMN. Esta escala de tiempos de RMN se refiere a cómo de rápido es un evento en relación con los observables de RMN (Figura 3.22). Un mismo proceso de intercambio puede ser rápido para un parámetro de RMN en concreto, pero ser, al mismo tiempo, un proceso lento para otro parámetro diferente.²³ Por este motivo, es importante tener en cuenta al describir si un evento es rápido o lento la escala de tiempos en la cual sucede.

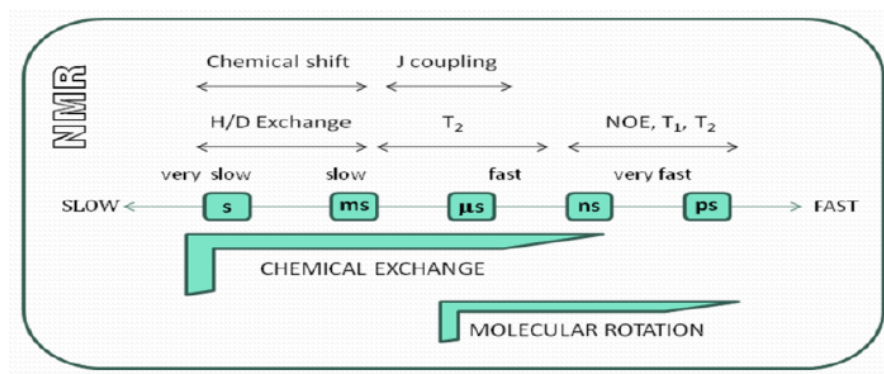


Figura 3.22 Escala de tiempos en RMN. (Imagen tomada de la presentación del Antonio Molinaro, Grenoble workshop glyco-proteins)

En nuestro caso concreto, los polímeros son lo bastante grandes como para que la relajación sea tan rápida que incluso sus señales de resonancia no se observen en el espectro de ^1H -RMN, debido a que la anchura de línea es inversamente proporcional al tiempo de relajación transversal (T_2). Teniendo en cuenta este hecho, al registrar espectros de ^1H -RMN de las glico-oligoamidas catiónicas libres y a continuación, en presencia de algún polímero de ADN, si existe asociación al ADN, los núcleos del ligando sentirán el efecto de la macromolécula. Sus señales de resonancia se ensancharán o incluso desaparecerán, dependiendo de la relación molar receptor/ligando, de la constante de asociación y de la cinética del proceso.

En base a este hecho, en nuestro laboratorio se ha diseñado un experimento de titulación en el que, manteniendo constante la concentración de glico-oligoamida catiónica, se van añadiendo cantidades crecientes del polímero de ADN y se registran espectros consecutivos en cada punto. De esta forma, se puede monitorizar y se evaluar el ensanchamiento de las señales de resonancia de ligando, traducido en una disminución de intensidad de señal hasta su completa desaparición. A continuación, aparecen tres experimentos basados en este hecho, que nos ha permitido obtener información valiosa de varias características de unión de la glico-oligoamida catiónica

2.

²³ Peng, J. W.; Lepre, C. A.; Fejzo, J.; Abdul-Manan, N.; Moore, J. M. In *Methods Enzymol.*; Thomas L. James, V. D., Uli, S., Eds.; Academic Press: 2002; Vol. Volume 338, p 202.

3.4.1.1 Estudios de interacción de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) y su análoga neutra β -D-Xil-Py- γ -Py-Ind (**1**) frente a Poly(dA-dT)₂

Para determinar si se ha producido una mejora de afinidad con el nuevo vector y observar si existe o no diferencia de comportamiento entre la glico-oligoamida neutra de xilosa **1** y su análoga catiónica **2** en su unión con el ADN, el experimento de titulación descrito en el párrafo anterior puede ser de gran utilidad.

Como se comentó anteriormente, el diseño del vector neutro, y posteriormente del catiónico, fue orientado a que estos ligandos mostrasen una selectividad de secuencia de bases con una preferencia hacia secuencias ricas en pares de bases AT. Estudios previos en nuestro grupo de investigación mostraron que las glico-oligoamidas neutras exhibían esa selectividad por pares de bases AT, y que los mejores valores de afinidad se lograban con el polímero Poly(dA-dT)₂.²⁴ Por este motivo, el experimento comparativo de ambas glico-oligoamidas de xilosa se realizó con este polímero.

Se realizaron dos experimentos: el primero con β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) adicionando Poly(dA-dT)₂, y el segundo con β -D-Xil-Py- γ -Py-Ind (**1**) adicionando también Poly(dA-dT)₂. En ambos casos se emplearon las mismas condiciones: los espectros se registraron en D₂O (tampón fosfato 10 mM, pH=7.3) a 25 °C. En cada uno de ellos se realizó un primer espectro con la glico-oligoamida de xilosa correspondiente en estado libre y, a continuación, se añadieron cantidades crecientes de Poly(dA-dT)₂, manteniendo constante la concentración de la glico-oligoamida en cada adición. Después de cada adición se registró un espectro de ¹H-RMN. La variación de las señales de la región aromática del espectro con la adición de Poly(dA-dT)₂ se puede observar en la Figura 3.23.

²⁴ Todas las concentraciones de los diferentes polímeros de ADN empleados a lo largo de esta tesis están expresadas en términos de par de bases.

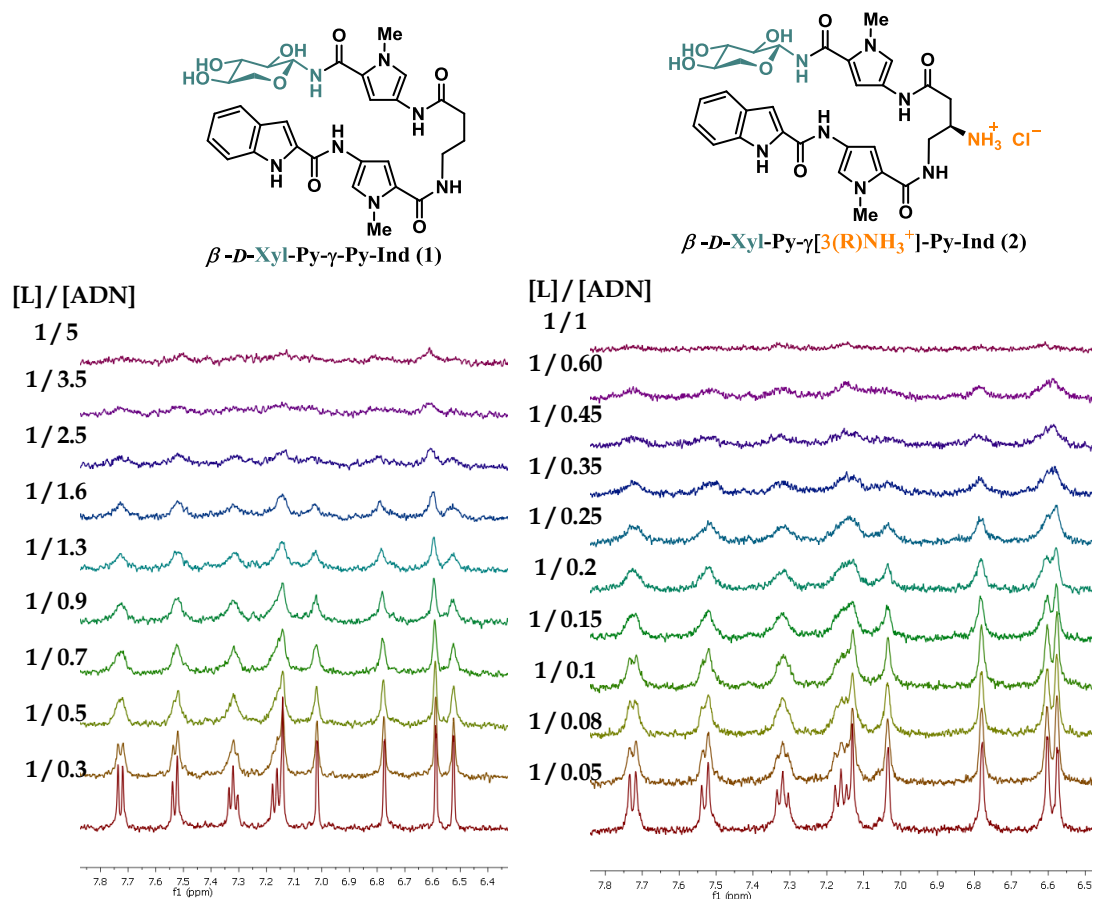


Figura 3.23 Ampliaciones de la zona aromática de los espectros ^1H -RMN de las titulaciones de las glico-oligoamidas de xilosa neutra (izquierda) y catiónica (derecha) con Poly(dA-dT)₂. Espectros en D₂O, tampón fosfato 10 mM, pH=7.3, a 25 °C

La adición de cantidades crecientes de Poly(dA-dT)₂ provoca, en ambos casos, la desaparición progresiva de las señales de resonancia de ambas glico-oligoamidas, indicando su unión al polímero de ADN. Como se esperaba, se observa que en el caso de la glico-oligoamida catiónica **2** es necesaria una menor concentración de polímero de ADN para hacer desaparecer por completo las señales de resonancia del compuesto. A nivel cualitativo, este hecho indica una mejora sustancial en la afinidad por el Poly(dA-dT)₂ de las glico-oligoamidas catiónicas con respecto a las neutras. En el caso de las glico-oligoamidas neutras, este tipo de experimentos de titulación llevó a la cuantificación de la interacción con ADN, siendo posible obtener un orden relativo de afinidades. Desafortunadamente, este análisis cuantitativo no se ha podido llevar a cabo con las glico-oligoamidas catiónicas por el régimen de intercambio en que se encuentran en su interacción con los polímeros de ADN. Por lo tanto, hay diversas consideraciones que se deben tener en cuenta al evaluar los resultados de este experimento.

En general, el análisis de la forma de línea de un espectro es un método directo de estudiar cualitativamente la dinámica de un proceso y poder determinar el régimen de intercambio en el que se halla el sistema.²⁵ El ensanchamiento de las señales de

²⁵ Craik, D.; Wilce, J. In *Protein NMR Techniques*; Reid, D., Ed.; Humana Press: 1997; Vol. 60, p 195.

resonancia depende del cambio del tiempo de correlación entre la especie libre y asociada, que puede ser muy significativo cuando el receptor es una macromolécula de gran tamaño, pero también es indicativo de la presencia de un equilibrio con una velocidad de intercambio entre la especie libre y la especie asociada intermedia-rápida con referencia a la escala de tiempos de δ . En este último caso también es posible observar una variación en el desplazamiento químico observado promediado entre los valores extremos de desplazamiento químico entre la forma libre y la forma totalmente unida. En general, en el equilibrio entre ligando libre y asociado, la anchura de línea observada depende de las fracciones molares correspondientes, de la constante de velocidad de intercambio y de los tiempos de relajación de los distintos estados. Es decir, que aún en exceso de ligando libre, las anchuras de línea se afectan, debido a la contribución del tiempo de relajación en el estado asociado. Además, si como se ha mencionado, la velocidad de intercambio tiene una cinética intermedia-rápida con referencia a la escala de desplazamiento químico, el ensachamiento de las señales observadas va acompañado de un desplazamiento de las señales del ligando a medida que aumenta la forma unida. Comúnmente, un intercambio rápido se asocia con ligandos de baja afinidad (Figura 3.24, situación C). En el otro extremo, está la existencia de un intercambio lento, donde formalmente se observan dos grupos de señales diferenciadas, un grupo corresponde a la forma libre en cuyas señales se apreciaría una disminución de intensidad, a medida que fuera aumentando la proporción de complejo y otro conjunto de señales para la forma unida que debiera aumentar según aumenta la concentración de forma unida pero que, en el caso que el receptor sea una macromolécula de gran tamaño, estas señales de la forma unida se comportarán de la misma manera que las resonancias propias del receptor ensanchándose igualmente y llegando incluso a confundirse con la línea base del espectro.

En general el intercambio rápido está asociado a equilibrios de baja afinidad ya que es necesario que el complejo se descomponga rápidamente para que el intercambio entre las dos formas (libre y unida) sea rápido mientras que el intercambio lento se suele asociar con ligandos con mayor afinidad por el receptor, el tiempo de residencia del ligando en el complejo es lo suficientemente largo para que sus señales de resonancia sean observables de manera diferenciada a la frecuencia característica de la forma unida (Figura 3.24, situación A). Sin embargo, lo más habitual es encontrar situaciones intermedias en las cuales las señales de resonancia entre los dos estados no llegan a diferenciarse y únicamente se observa una señal promediada pero con un ensanchamiento adicional (independiente del originado por el cambio del tiempo de correlación en la forma unida) debido a la cinética del intercambio extremas anteriormente descritas, dificultándose el análisis de los datos (Figura 3.24, situación B).

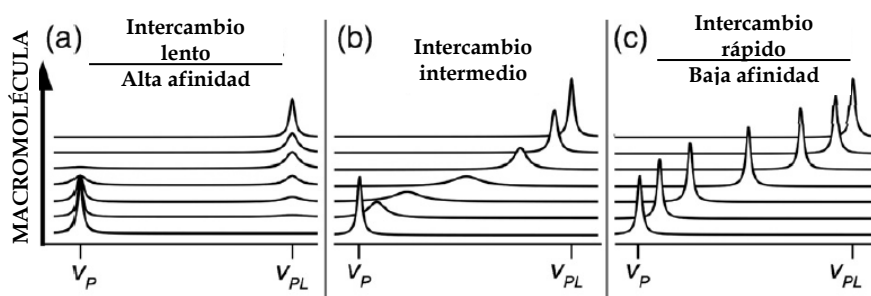


Figura 3.24 Representación de la variación de las señales de RMN de una molécula al pasar de su forma libre a su forma asociada, en régimen de intercambio lento (A), régimen intermedio (B) y régimen de intercambio rápido (C).

El análisis de línea de nuestro sistema catiónico muestra que el proceso de unión se encuentra en situación de intercambio intermedio a lento, ya que no sólo hay un ensanchamiento de línea, sino también una pérdida de intensidad de señal. Al estar en una situación intermedia el análisis se complica, no siendo posible realizar un tratamiento directo y cuantitativo de los datos. Además, en nuestro caso particular, este análisis resulta todavía más complejo por la imposibilidad de ver la señal correspondiente a la forma unida, ya que las señales del complejo no son observables debido a su elevado peso molecular. Un examen más detallado de las señales, a medida que aumenta la concentración de Poly(dA-dT)₂ en el medio, muestra que, en el experimento con el ligando neutro (**1**) se observan variaciones en los desplazamientos químicos de algunas señales de hasta 12 Hz, indicando un régimen de intercambio de intermedio a rápido. En el experimento análogo con el ligando catiónico (**2**) las señales permanecen sin apenas variación, indicando un régimen más cercano al intercambio lento. Esta variación de régimen de intercambio, hace que debamos ser cautelosos a la hora de comparar los experimentos de ambos tipos de glico-oligoamidas, catiónicas y neutras, pudiendo solo realizar una evaluación cualitativa. No es posible saber, a nivel cuantitativo, en cuánto se ha mejorado la afinidad de la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2** frente a la neutra **1**. Sin embargo a nivel cualitativo, la desaparición total de las señales de resonancia de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) con una concentración de Poly(dA-dT)₂ cinco veces menor que la necesaria para hacer desaparecer las señales de β -D-Xil-Py- γ -Py-Ind (**1**), revela una mejora en la afinidad por el ADN. Conjuntamente, el cambio de régimen de intercambio mostrado por la glico-oligoamida catiónica **2** (intermedio-lento) apoya esta teoría, puesto que un régimen de intercambio lento suele asociarse con ligandos con mayores constantes de asociación.

3.4.1.2 Experimento de competición entre β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) y su análoga neutra β -D-Xil-Py- γ -Py-Ind (**1**) frente a Poly(dA-dT)₂

Ante la imposibilidad de cuantificar los resultados de las valoraciones y para poder respaldar los datos de afinidad relativa obtenidos de ellas, se realizó un experimento de competición entre ambas glico-oligoamidas con Poly(dA-dT)₂. En este tipo de experimento de competición es importante que las condiciones experimentales sean iguales para ambos ligandos. De esta forma, las diferencias observadas durante el

experimento serán, en principio, solamente atribuibles a las diferencias en la afinidad de ambos compuestos por el Poly(dA-dT)₂.

En primer lugar, para que ambas glico-oligoamidas estén en las mismas condiciones se debe preparar una disolución que las contenga a ambas en la misma concentración. A continuación, se registra un primer espectro ¹H-RMN para comprobar que ambas glico-oligoamidas están a la misma concentración y para identificar qué señales corresponden a cada una. Después, se van añadiendo cantidades crecientes de Poly(dA-dT)₂ sobre esa disolución y registrando espectros en cada punto. De esta forma, se monitoriza el distinto comportamiento de las señales de ambas glico-oligoamidas a la vez. Las resonancias del compuesto que posee una mayor afinidad por Poly(dA-dT)₂ sufrirán un mayor ensanchamiento y la intensidad de sus resonancias disminuirá de manera más notable. En la Figura 3.25 se muestra la región aromática del experimento de competición, donde se observa solapamiento de señales tanto en las señales de los pirroles como en las del indol. Sin embargo, se puede ver cómo la resonancia Py-3^A de la glico-oligoamida de xilosa neutra **1**, apenas se ensancha con las adiciones crecientes de Poly(dA-dT)₂. Mientras, el resto de señales solapadas pierden intensidad por la desaparición progresiva de las resonancias de la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2**. En la Figura 3.26, se muestra la zona del espectro donde se encuentran las resonancias correspondientes al carbohidrato y al fragmento γ. Afortunadamente, hay un menor solapamiento de señales en esta región y es posible observar claramente cómo las resonancias correspondientes a la glico-oligoamida catiónica **2** desaparecen progresivamente con la adición del Poly(dA-dT)₂, mientras las de su análoga neutra permanecen, sin disminuir su intensidad. Para una relación molar [L]/[Poly(dA-dT)₂] igual a 1/1, las señales de la glico-oligoamida catiónica **2** han desaparecido por completo. Sin embargo, para esa misma relación molar, las señales de glico-oligoamida neutra **1**, permanecen prácticamente sin cambio alguno en su intensidad.

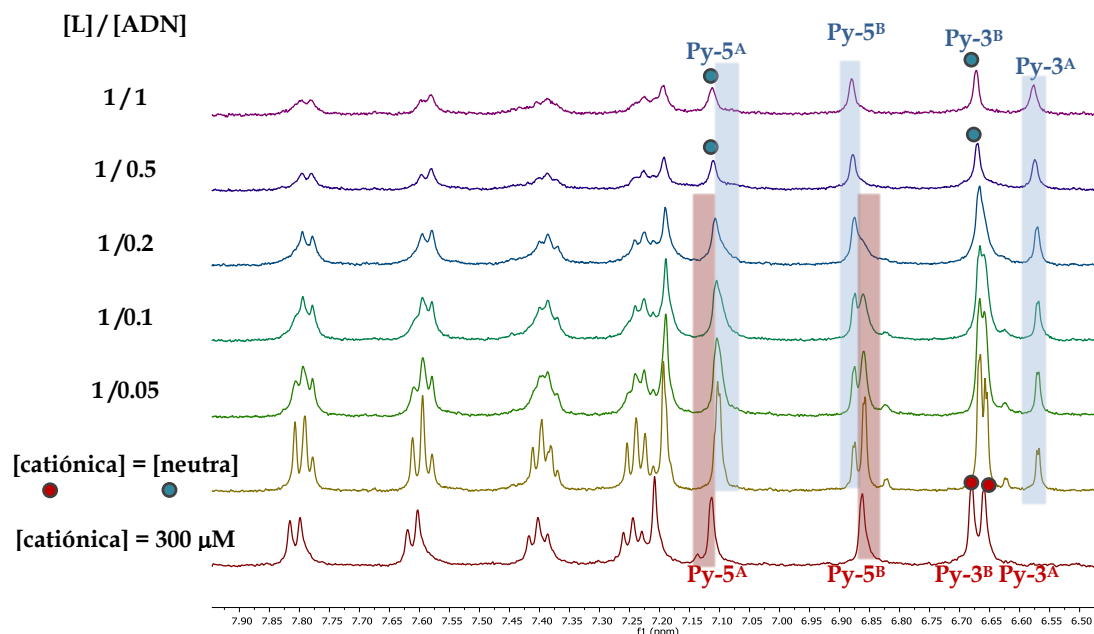


Figura 3.25 Ampliación de la zona aromática de los espectros ^1H -RMN del experimento de competición de las glico-oligoamidas $\beta\text{-D-Xil-Py-}\gamma\text{-(R)NH}_3^+\text{-Py-Ind}$ (2) y su análoga neutra $\beta\text{-D-Xil-Py-}\gamma\text{-Py-Ind}$ (1) frente a Poly(dA-dT)_2

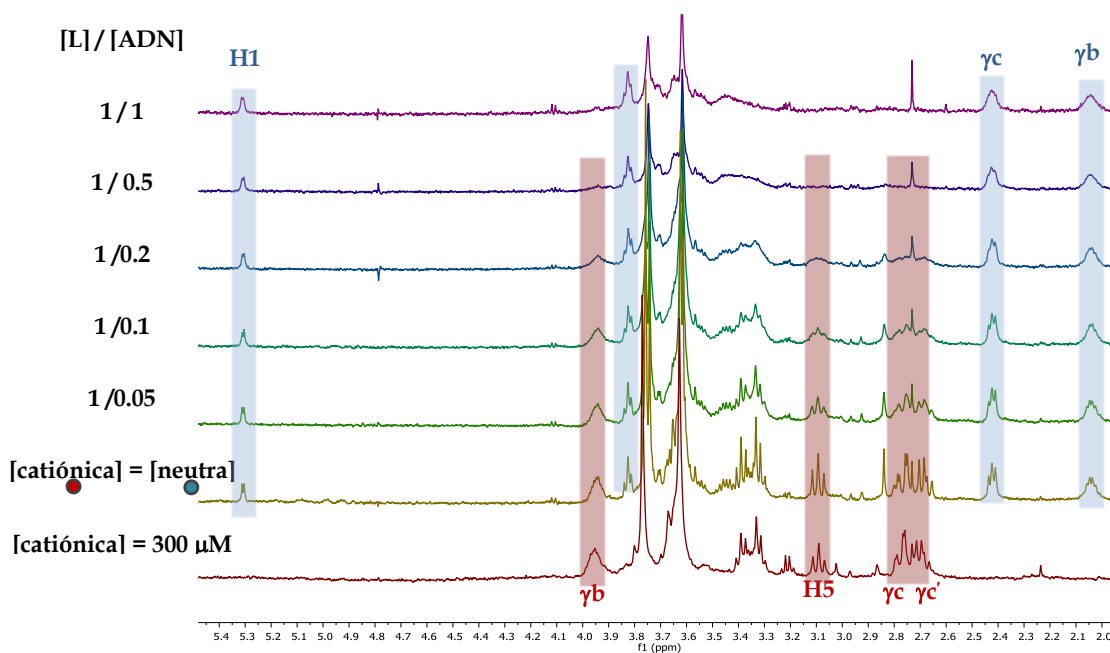


Figura 3.26 Ampliación de la zona del carbohidrato y del fragmento de los espectros ^1H -RMN del experimento de competición de las glico-oligoamidas $\beta\text{-D-Xil-Py-}\gamma\text{-(R)NH}_3^+\text{-Py-Ind}$ (2) y su análoga neutra $\beta\text{-D-Xil-Py-}\gamma\text{-Py-Ind}$ (1) frente a Poly(dA-dT)_2

Un dato que nos puede dar información extra, es la comparación de las intensidades relativas (I_{obs}/I_0)²⁶, de la glico-oligoamida neutra **1** en los dos experimentos anteriores: la titulación con Poly(dA-dT)_2 y la competición entre ambos

²⁶ I_{obs}/I_0 , siendo I_{obs} la intensidad observada de las señales del ligando tras cada adición de ADN e I_0 la intensidad de las señales del ligando en ausencia de ADN normalizada a 1.

compuestos. Se observa que las intensidades relativas de las señales, en el mismo punto de relación molar 1/0.5 de ambos experimentos son diferentes. El valor de I_{obs}/I_0 para la señal Py-3^A en la titulación es de 0.564, mientras que ese valor en el experimento de competición es de 0.826. Ambas glico-oligoamidas están compitiendo por los sitios de unión al ADN y esta diferencia de intensidades indica que la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2** se está uniendo preferentemente al Poly(dA-dT)₂, impidiendo en primera instancia la unión del derivado neutro **1**.

Con este experimento, se corroboran los estudios de interacción previos donde se concluía que se había mejorado la afinidad de la glico-oligoamida cargada respecto de la neutra.

3.4.1.3 Estudio de la selectividad de secuencia de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**).

Una característica interesante de las glico-oligoamidas neutras era su selectividad de secuencia. La introducción de un grupo funcional que portase una carga positiva podía provocar una inespecificidad de secuencia en los nuevos ligandos catiónicos. Por ello, era importante determinar si las nuevas glico-oligoamidas catiónicas seguirían mostrando cierta preferencia por pares de bases AT. Las glico-oligoamidas neutras no forman complejos estables con Poly(dG-dC)₂, por lo que sus estudios de selectividad de secuencia se realizaron con *ct*-ADN (60% de pares de bases AT frente a un 40% de pares GC), a pesar de que su secuencia de bases es aleatoria.²⁷ Por este motivo, hasta el momento, no había sido posible acceder a secuencias compuestas solamente por pares de bases CG. Dado el buen comportamiento de la glico-oligoamida catiónica de xilosa con secuencias AT mostrando una mejora de afinidad con respecto a las glico-oligoamidas neutras, se decidió realizar experimentos con poly(dG-dC)₂.

Se puso en práctica la misma metodología que en el apartado anterior realizándose titulaciones por RMN y se registraron espectros ¹H-RMN (D₂O, tampón fosfato 10 mM, pH=7.3, a 25 °C) consecutivos con adiciones crecientes de poly(dG-dC)₂, manteniendo constante la concentración de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**). En la Figura 3.27, se observa la desaparición progresiva de las señales del ligando en ambos experimentos a medida que aumenta la concentración de los polímeros de ADN en el medio. De esta forma se demuestra que β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) se une a ambas secuencias de ADN. Sin embargo, para la desaparición completa de las señales del espectro, se necesita una concentración tres veces menor de Poly(dA-dT)₂ que de poly(dG-dC)₂, indicando, cualitativamente, una mayor afinidad de la glico-oligoamida catiónica de xilosa por secuencias ricas en AT.

Si se presta atención a la forma de línea en cada experimento, en esta ocasión también se puede ver un distinto comportamiento de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**), en función de con qué tipo de polímero de ADN interacciona. Ya se ha descrito en el apartado anterior que este ligando con Poly(dA-dT)₂ se encuentra en un régimen de

²⁷ Ragazzon, P. A.; Garbett, N. C.; Chaires, J. B. *Methods* **2007**, 42, 173-182.

intercambio intermedio-lento, asociado a ligando de mayor afinidad. Sin embargo, en el caso de su interacción con secuencias GC, se observan variaciones en los desplazamientos químicos. Esto en conjunto con el ensanchamiento de línea, muestra una situación característica de un régimen de intercambio intermedio-rápido. Al mismo tiempo, este cambio de régimen de intercambio es también indicativo de una peor afinidad de la glico-oligoamida catiónica con secuencias GC. De esta forma, se pone de manifiesto que el vector catiónico muestra preferencia por pares de bases AT y, por tanto, tiene cierta selectividad de secuencia.

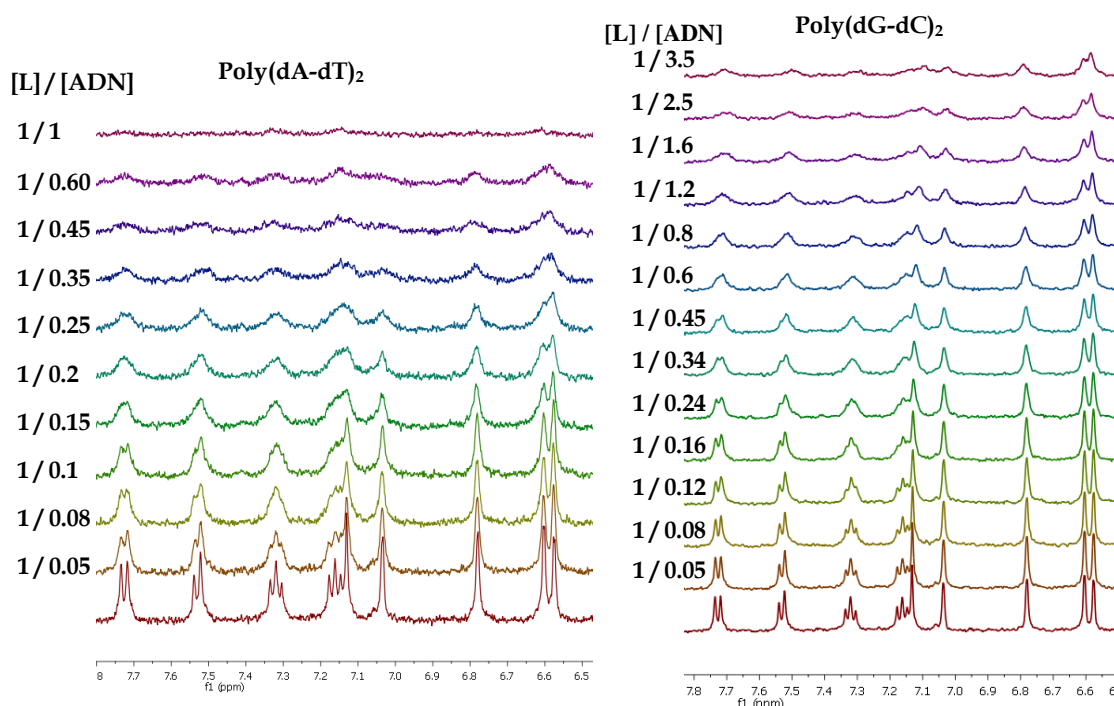


Figura 3.27 Ampliaciones de la zona aromática de los espectros ^1H -RMN de las titulaciones de la β -D-Xil-Py- γ [(R) NH_3^+]-Py-Ind (2) con Poly(dA-dT) $_2$ (izquierda) y con Poly(dG-dC) $_2$ (derecha). Espectros en D_2O , tampón fosfato 10 mM, pH=7.3, a 25 °C

Es importante destacar que, al mismo tiempo que estos ligandos muestran preferencia por pares de bases AT, por primera vez, se tiene un compuesto capaz de interaccionar con secuencias formadas exclusivamente por pares de bases GC. Por tanto, la mejora en afinidad ha permitido que, por primera vez, haya sido posible aproximar el carbohidrato a secuencias de este tipo. Esto adquiere relevancia en el estudio estructural de los complejos glico-oligoamida-ADN y amplía la posibilidad de caracterizar requerimientos básicos clave en el reconocimiento molecular carbohidrato-ADN.

3.4.1.4 Experimento de competición entre β -D-Xil-Py- γ [(R) NH_3^+]-Py-Ind (2) y netropsina frente a poly(dA-dT) $_2$

La netropsina es un ligando específico de secuencias AT del surco menor del B-ADN que se asocia al poly(dA-dT) $_2$ con una constante de asociación elevada (K_a =

$22 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$).²⁸ Se ha demostrado que la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2** se une al poly(dA-dT)_2 y, aunque no se haya podido cuantificar su interacción, con toda seguridad, no llega a ser un ligando tan eficaz como la netropsina. Por lo tanto, si ambos ligandos comparten sitios de unión en el ADN, la netropsina podría ser capaz de desplazar a $\beta\text{-D-xil-Py-}\gamma[(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ (**2**) del complejo que forma con el poly(dA-dT)_2 . Así, la realización de un experimento de competición con este ligando nos podría dar información sobre el sitio de unión de las glico-oligoamidas catiónicas.

Basándonos en esta hipótesis y empleando la misma metodología de titulación usada en los apartados anteriores, se llevó a cabo un experimento de competición por RMN (Figura 3.28). En él se prepara una disolución de $\beta\text{-D-Xil-Py-}\gamma[(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ (**2**) (D_2O , tampón fosfato 10 mM, $\text{pH}=7.3$), se registra un espectro de $^1\text{H-RMN}$ a 25°C , se añaden cantidades crecientes de poly(dA-dT)_2 para formar el complejo y este proceso se monitoriza mediante $^1\text{H-RMN}$. La evolución de la región aromática del espectro durante el experimento se muestra en la Figura 3.28. Como se ha comentado anteriormente, cuando el ligando se une al ADN y se forma el complejo, las señales correspondientes a la glico-oligoamida catiónica desaparecen. En este punto se empiezan a añadir cantidades crecientes de una disolución de netropsina (10^{-2} M) a la muestra con el complejo formado y se continúa monitorizando el proceso registrando espectros $^1\text{H-RMN}$. De esta forma, se observa la reaparición progresiva de las señales de resonancia correspondientes a $\beta\text{-D-Xil-Py-}\gamma[(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ (**2**), a medida que la netropsina la va desplazando de su sitio de unión. Finalmente, al hallarse ésta en exceso, se llegan también a observar las señales de resonancia de la netropsina.

El hecho de que la netropsina desplace a la glico-oligoamida catiónica **2** en un complejo preformado con poly(dA-dT)_2 permite concluir que ambos ligandos comparten sitio de unión y constituye una prueba indirecta de que las glico-oligoamidas catiónicas se asocian al surco menor.

²⁸ Marky, L. A.; Breslauer, K. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 4359-4363.

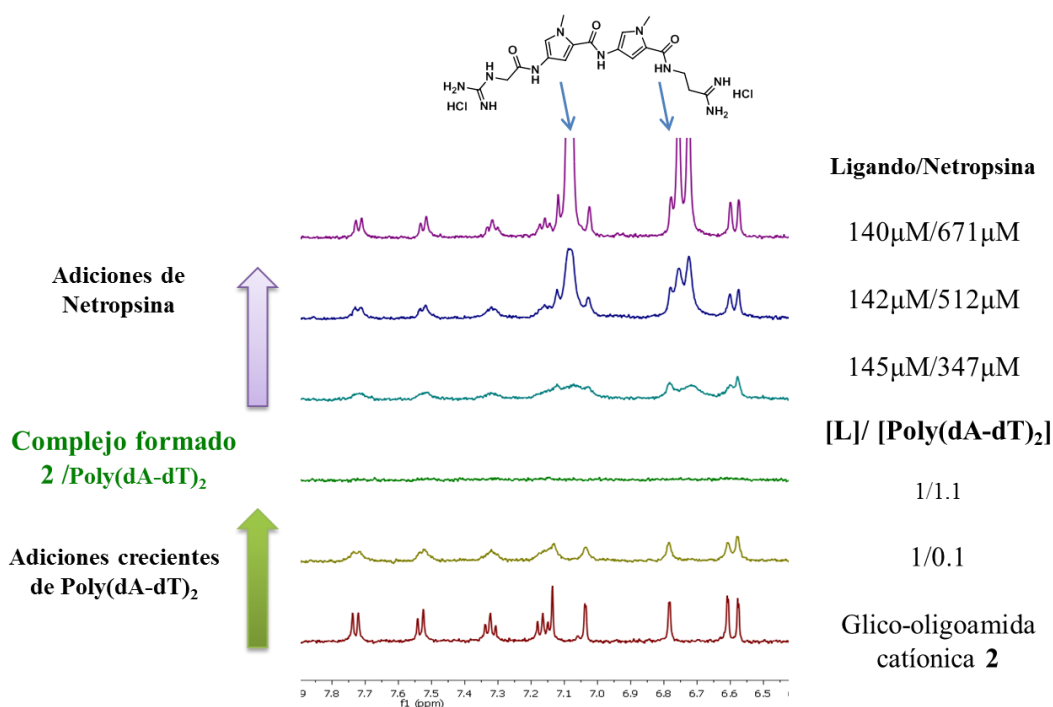


Figura 3.28 Experimento de competición entre la glico-oligoamida catiónica 2 y la netropsina con poly(dA-dT)₂.

3.4.2 Caracterización de la conformación de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) en el estado asociado con Poly(dA-dT)₂ y Poly(dG-dC)₂

Una vez confirmada la unión de la nueva glico-oligoamida catiónica de xilosa 2 con los distintos polímeros de ADN, era importante estudiar si había un cambio conformacional del ligando en el estado asociado en presencia del receptor. Para caracterizar la conformación de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind en sus diferentes complejos, se empleó de nuevo la RMN. En esta ocasión, se emplearon métodos que permiten obtener información estructural del ligando en el estado asociado, basados en la transferencia de magnetización, ya sea una transferencia intramolecular (del inglés, transferred nOe, tr-NOESY) o intermolecular (del inglés, Saturation Transfer Difference, STD).²⁹

3.4.2.1 Experimentos de efecto Overhauser nuclear transferido (tr-NOE)

El efecto Overhauser nuclear transferido se emplea para determinar la estructura tridimensional de ligandos en el sitio de reconocimiento de sus receptores (proteínas o ácidos nucleicos) y los cambios conformacionales existentes respecto a la conformación en el estado libre.³⁰ En particular, es una técnica muy eficaz en el estudio de complejos

²⁹ Fernandez-Alonso, M. d. C.; Alvaro Berbis, M.; Canales, A.; Arda, A.; Javier Canada, F.; Jimenez-Barbero, J. In *New Applications of NMR in Drug Discovery and Development*; The Royal Society of Chemistry: 2013, p 7

³⁰ Balaram, P., Bothner-By A. A.; Breslow, E. J. *Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4017-4018.(b) Balaram, P., A. A. Bothner-By and J. Dadok, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4015-4017.

proteína-carbohidrato.³¹ Esencialmente, la técnica se basa en el cambio de signo de los picos de cruce nOe de un ligando libre con la adición de un receptor. Con la simple observación del espectro 2D obtenido, es posible saber si existe la unión entre el ligando y el receptor. La observación de tr-NOESY reside en la existencia de diferentes tiempos de correlación (τ_c) para una molécula pequeña en su estado libre o asociado. Entre los spines de las moléculas de bajo peso molecular (<500 Dalton), con tiempos de correlación en la escala de los picosegundos, las interacciones dipolares producen nOes positivos (expresados en los experimentos bidimensionales de tipo NOESY con picos de cruce de distinto signo que la diagonal), cercanos a cero o nOes muy débiles negativos (500-2000 Dalton) y de baja intensidad ($nOe_{max} < +50\%$), debido a su lenta velocidad de relajación (σ_L). En cambio, las macromoléculas, con tiempos de correlación mayores (escala de nanosegundos), exhiben nOes negativos y muy intensos ($nOe_{max} = -100\%$), su velocidad de relajación (σ_R) es mucho mayor. Cuando una molécula pequeña se asocia a un receptor, esta adopta las propiedades nOe de la macromolécula y por tanto, en un equilibrio entre estado libre y asociado, el nOe estará dominado por la forma asociada.³²

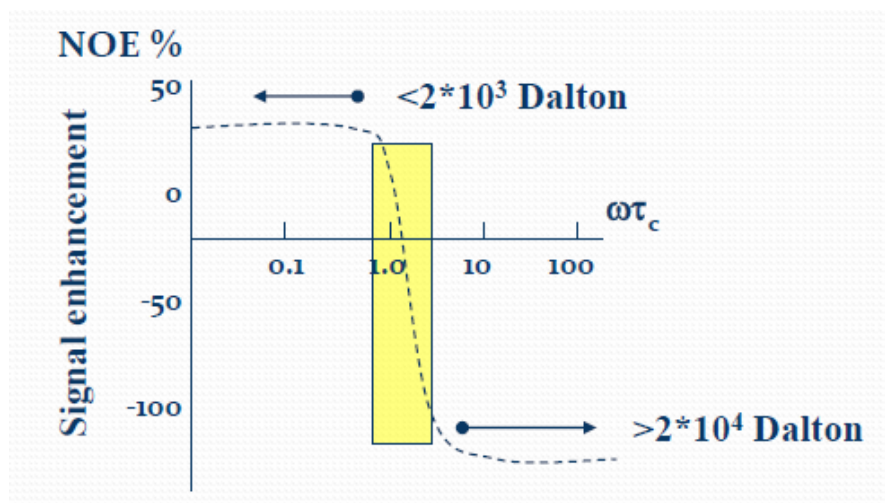
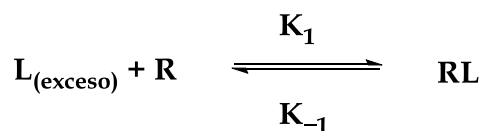


Figura 3.29 Variación del nOe con el tiempo de correlación (τ_c) y la frecuencia (ω)

El tr-NOESY se realiza mediante una secuencia NOESY normal pero aplicada a un ligando en intercambio entre su estado libre y asociado, donde el ligando está en exceso respecto al receptor. Si en estas condiciones consideramos un ligando (L), en equilibrio entre sus estados libre y asociado a su receptor (R), la constante de velocidad de relajación cruzada observada (σ_{obs}) será un promedio de las velocidades de la molécula pequeña (σ_L) y el complejo receptor-ligando (σ_{RL}), teniendo en cuenta sus fracciones molares correspondientes (X_L y X_{RL}) (Ecuación 1).

³¹ (a) Asensio, J.L.; Cañada, F. J.; Jimenez-Barbero, J. *Eur. J. Biochem.* **1995**, 233, 618-630. (b) Enríquez-Navas, P.M., Marradi, M.; Padro, D.; Angulo, J.; Penadés, S. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 1547-1560. (c) Thépaut, M., Guzzi, C.; Sutkevičiute, I.; Sattin, S.; Ribeiro-Viana, R.; Varga, N.; Chabrol, E.; Rojo, J.; Bernardi, A.; Angulo, J.; Nieto, P. M.; Fieschi, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 2518-2529.

³² (a) Poveda, A.; Jimenez-Barbero, J. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 133-144. Jiménez-Barbero, J.; Peters, T. In *NMR Spectroscopy of Glycoconjugates*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2003, p 289.



$$\sigma_{obs} = X_L \sigma_L + X_{RL} \sigma_{RL} \quad (1)$$

$$\sigma_{RL} \gg \sigma_L \rightarrow X_{RL} \sigma_{RL} > X_L \sigma_L \quad (2)$$

La velocidad de relajación del estado asociado (σ_{RL}), relacionada directamente con el nOe, es siempre mayor que la del ligando libre (σ_L), por lo que la contribución del término del complejo a la velocidad de relajación observada será mayor (Ecuación 2). Sin embargo, para poder observar esta perturbación debida a la formación del complejo en el espectro NOESY, necesariamente se debe dar la condición adicional de que el intercambio entre las dos especies, libre y asociada, sea lo suficientemente rápido, y concretamente que, la constante de disociación (K_{-1}) sea mayor que la velocidad de relajación del complejo (Ecuación 3).

$$K_{-1} \gg \sigma_{RL} \quad (3)$$

De esta manera las señales del ligando que se observan contendrán todavía la información del estado asociado. Si la constante de disociación fuese menor que la velocidad de relajación del complejo, se perdería la información nOe del estado asociado, ya que el efecto desaparece por relajación antes de que se disocie el complejo. Por lo tanto, habiendo un exceso de ligando, la condición que se debe dar para que se pueda aplicar esta técnica es que el intercambio entre la forma libre y asociada sea rápido en la escala de tiempos de la relajación. De esta forma, es posible registrar un espectro NOESY del ligando en presencia del receptor, donde la información de los nOe que se obtienen corresponden a la conformación del ligando asociado (Figura 3.30). Este experimento permite determinar si existe asociación del ligando con el receptor, y además, identifica la estructura tridimensional del ligando en el sitio activo del receptor.

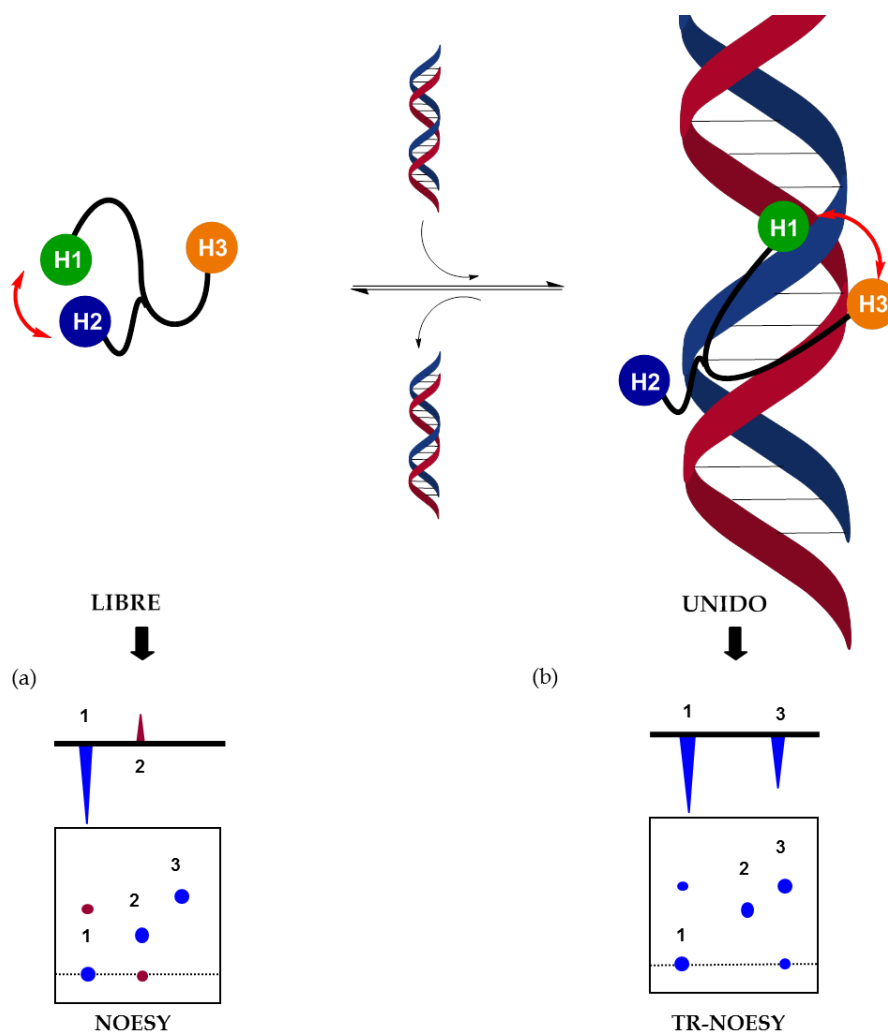


Figura 3.30 Izquierda, representación esquemática del experimento NOESY del ligando libre, con *nOes* positivos y de signo contrario a la diagonal. Derecha, representación esquemática del experimento TR-NOESY para un sistema ligando-receptor, *nOes* intensos, negativos y del mismo signo que la diagonal, se presentan las trazas que cortan la diagonal sobre el pico 1. Este experimento contiene la información conformacional del ligando en el estado asociado a la macromolécula.

Un problema que puede surgir en la realización de estos experimentos, es la posible existencia de difusión de spin, un proceso típico en macromoléculas. La difusión de spin se produce por transferencia de magnetización entre dos spines espacialmente alejados, pero que están próximos a otro o varios spines comunes, que actúan como intermediarios de la transferencia, dando lugar a picos de cruce observables entre espines alejados. Es importante determinar el tiempo de mezcla (τ_m) óptimo para minimizar este proceso. El tiempo de mezcla es el tiempo que se emplea para transferir la magnetización a través de la relajación dipolar. El uso de tiempos de mezcla largos implica una mayor probabilidad de detección de *nOes* entre protones relativamente alejados, aunque también favorece la difusión de spin.

En nuestro caso, para poner a punto el método, se realizaron varios tr-NOESY de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) en presencia de Poly(dA-dT)₂ con una relación molar [ligando]/[DNA]_{pb} = 1/0.05, a diferentes tiempos de mezcla (τ_m = 50, 100, 200 y 400 ms). En todos los casos, se obtuvieron espectros tr-NOESY de la glico-oligoamida

catiónica (**2**) con nOes intensos y negativos (a diferencia de lo que sucedía en el estado libre, donde los nOes eran débilmente negativos), indicando, por tanto, la unión ligando/macromolécula. Los mejores resultados, en términos de mayor relación señal/ruido y con difusión de spin poco significativa, fueron los obtenidos con un τ_m de 200 ms. A continuación se muestra el espectro obtenido para β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) con Poly(dA-dT)₂ en D₂O a 25 °C (Figura 3.31) con un tiempo de mezcla de 200 ms a 500MHz.

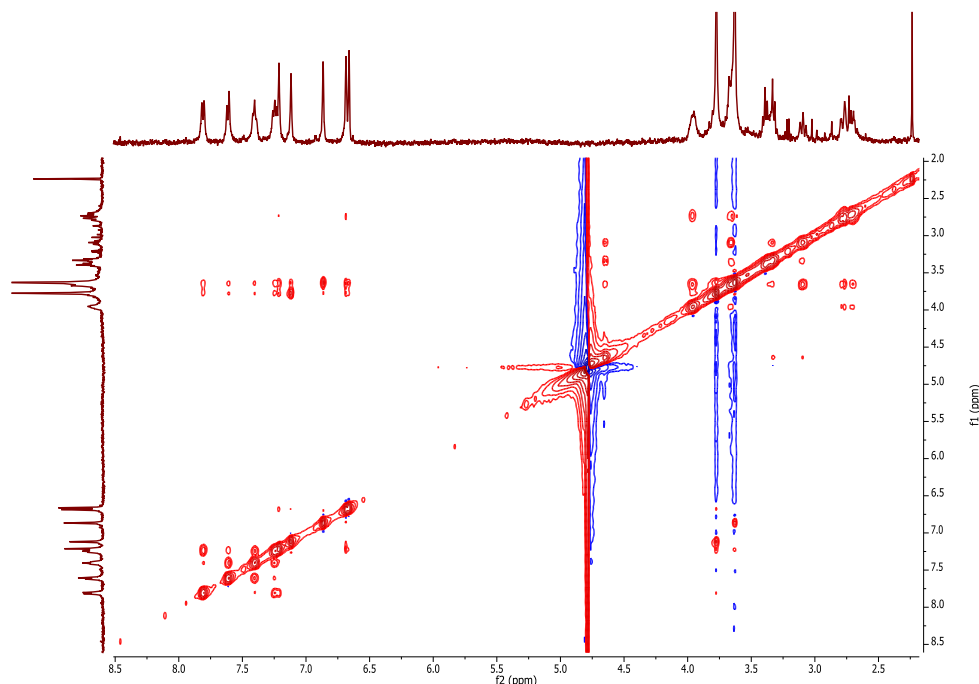


Figura 3.31 Espectro TR-NOESY de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) [250 μ M] con Poly(dA-dT)₂ en D₂O a 25 °C con un T_m = 200ms. (Relación ligando/DNA = 1/0.05)

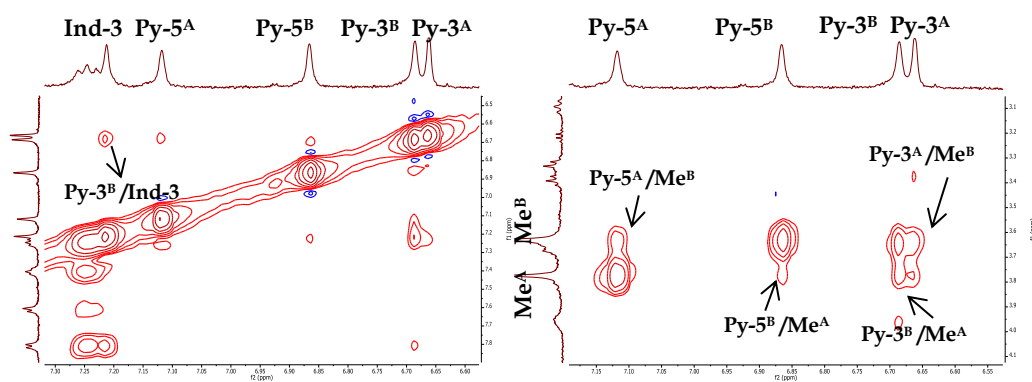


Figura 3.32 Ampliación de las regiones espectrales aromáticas del TR-NOESY de β -D-xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) [250 μ M] con Poly(dA-dT)₂ en D₂O

En la Figura 3.32 se muestran las ampliaciones de las regiones espectrales que contienen picos de cruce inter-hebra característicos, que confirman la conformación de horquilla adoptada por la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2** en el estado enlazado.

En concreto, se observan picos de cruce entre protones de los dos pirroles A y B (Py-5^A/Me^B y Py-5^B/Me^A) y entre el protón 3 del indol y el pirrol B (Py-5^B/Ind-3). Desafortunadamente, no se han detectado nOes carbohidrato/indol que permitan definir la cara del carbohidrato orientada hacia el indol.

Con intención de obtener más información del sistema, se ha llevado a cabo el mismo experimento, pero en H₂O para poder detectar las señales de los protones intercambiables de la amidas. El espectro tr-NOESY completo se muestra en el anexo de este capítulo, Figura 5. Se detectaron nOes inter-hebra típicos de la conformación plegada, iguales a los encontrados en el tr-NOESY en D₂O. Además, en las ampliaciones mostradas a continuación (Figura 3.33) se pueden ver picos de cruce nOe característicos de la forma arqueada de este tipo de oligoamidas y observada también en la conformación del estado libre (NH3/Py-3^A y NH5/Py-3^B). Por último, también se observa un pico de cruce importante para determinar la conformación del enlace amido-glicosídico en el estado asociado, el nOe intra-hebra NH5/H2. Este nOe, en conjunto con el nOe NH5/Py-3^B, permiten confirmar la configuración Z del enlace amido-glicosídico con una contribución predominante del conformero *anti*.

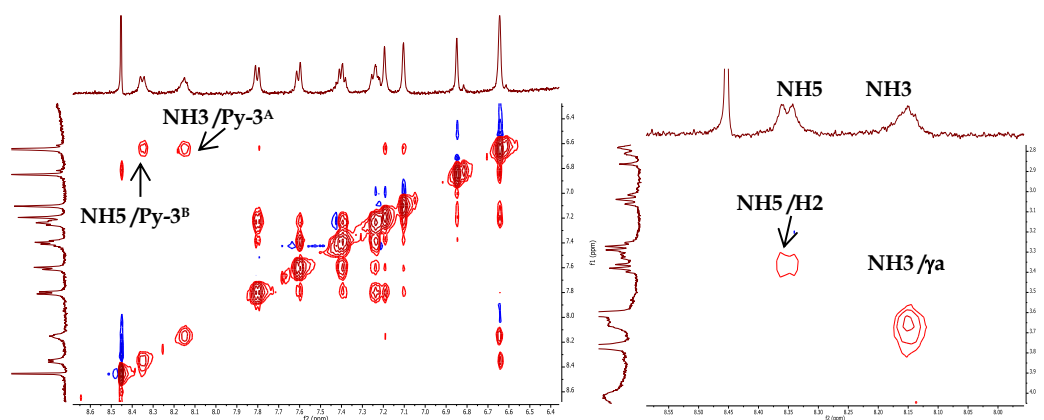


Figura 3.33 Ampliación de las regiones espectrales del TR-NOESY de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) [300 μ M] con Poly(dA-dT)₂ en H₂O a 5°C con un T_m = 200ms. (Relación ligando/DNA = 1/0.05)

En la siguiente Figura 3.34, se muestran resumidos los nOes encontrados en ambos experimentos tr-NOESY del complejo β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2)/Poly(dA-dT)₂ en D₂O y en H₂O. Se aprecian los nOes inter-hebra de la conformación plegada, además de nOes intra-hebra que caracterizan la forma arqueada de la glico-oligoamida catiónica, definiendo el arco N-Me y el arco NH.

3.4.2.2 Experimentos Differential-Frequency Saturation Transfer Difference (DF-STD)

El experimento de diferencia de transferencia de saturación (STD) ha sido utilizado extensamente para el estudio de complejos ligando-proteína. Permite determinar si hay asociación y, en casos favorables, cuáles son las zonas del ligando que se encuentran en contacto directo con el centro de reconocimiento de la proteína.³³ El STD se basa en la saturación selectiva de distintos residuos de aminoácido de la proteína receptora, donde no existen resonancias de los protones del ligando. La irradiación da lugar, por difusión de espín, a la transferencia de magnetización a todos los protones de la proteína, incluidos los protones de los residuos del sitio de reconocimiento y, lo que es más importante, si hay interacción, a las resonancias del ligando que está en contacto con éste. Cuando el equilibrio entre la especie libre y asociada es rápido en la escala de tiempos de la relajación, la transferencia de la magnetización que se produce en el ligando asociado se transmite al ligando libre (como sucede en el tr-NOESY). Desde un punto de vista técnico, este experimento se realiza obteniendo un espectro diferencia. Es decir, en primer lugar se realiza la saturación selectiva de algunos protones de la proteína (irradiando a la zona aromática, 7-8 ppm, o a la zona alifática, -1 ppm) donde no hay señales de RMN del ligando (*on-resonance*). La saturación se transfiere de forma efectiva por difusión de espín por toda la macromolécula, incluyendo los protones del centro de reconocimiento. De esta forma, cualquier molécula unida al sitio de unión de la proteína verá afectadas también sus señales de resonancia. Después, se adquiere otro espectro, aplicando una irradiación en una zona del espectro donde no hay señales (40 ppm) (*off-resonance*). El espectro STD se obtiene al restar ambos espectros. El espectro diferencia, STD, solo contendrá las señales de los ligandos que interaccionen con el receptor. Además, con este experimento es posible distinguir las señales del ligando más próximas al sitio de unión de las que están alejadas de éste, si se selecciona adecuadamente el tiempo de saturación (Figura 3.36).

³³ Mayer, M.; Meyer, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1784-1788. (b) Meyer, B.; Peters, T. *Angew. Chem.* **2003**, 115, 890-918. (c) Meyer, B.; Peters, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 864-890.

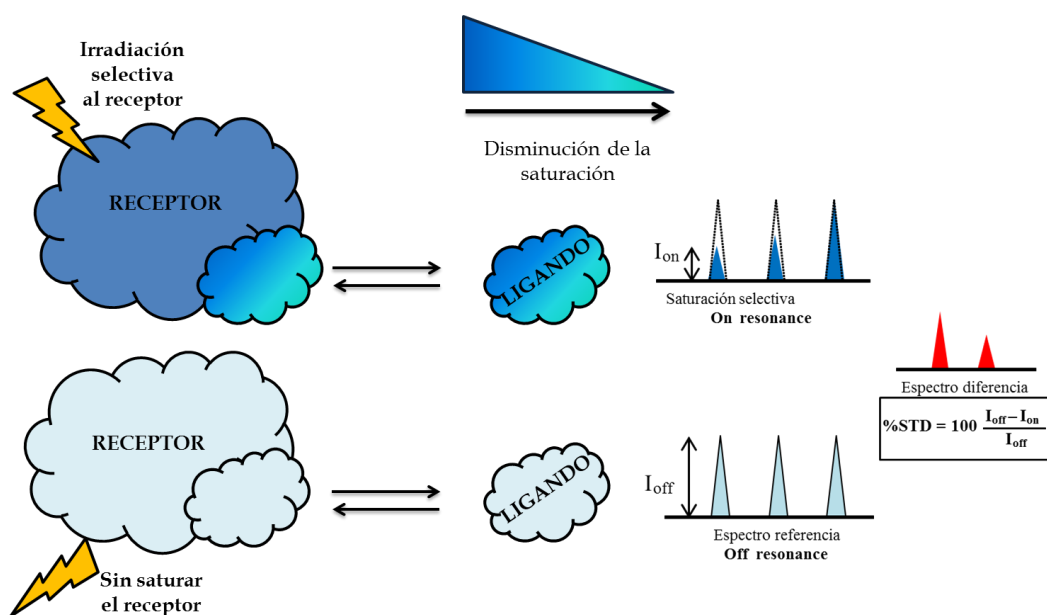


Figura 3.36 Representación esquemática del experimento STD. La diferencia entre el experimento off-resonance (abajo) y on-resonance (arriba) da lugar al espectro diferencia (STD en rojo) en el cual sólo aparecen las resonancias del ligando afectadas por la transferencia de magnetización. Los valores de intensidad están relacionados con la proximidad de los protones del ligando al sitio de reconocimiento de la macromolécula.

La técnica STD ofrece varias ventajas: una cantidad pequeña de macromolécula sin marcar isotópicamente y sin límite de tamaño, facilidad y rapidez en el cribado de mezclas de posibles ligandos,³⁴ posibilidad de realizar experimentos en células vivas³⁵ y una rápida caracterización de la región del ligando más cercana al receptor (epítipo).³⁶ La principal limitación, común en todas las aproximaciones de RMN basadas en la observación del ligando, reside en la imposibilidad de obtener información directa del centro de reconocimiento del receptor. De hecho, la elevada eficiencia con la que se transfiere la saturación en macromoléculas globulares, evita la observación de cualquier efecto local que pueda ser usado para determinar el modo y el sitio de unión de un ligando al receptor.

Gracias a la diferencia de dimensiones vertical y horizontal de hélices largas de ADN, esta macromolécula es una excepción a la consideración anterior para macromoléculas globulares. Esta característica estructural genera una marcada anisotropía en la eficiencia de difusión de la saturación a lo largo de los dos ejes. De este modo, el resultado del experimento STD con ADN es diferente del que se da para proteínas. Es decir, el efecto anisotrópico en la difusión de la saturación genera distintos resultados experimentales, en función de la frecuencia de saturación elegida; en definitiva, de la región espectral del ADN escogida para su irradiación selectiva. Gomez-Paloma y colaboradores, emplearon esta característica intrínseca de la doble

³⁴ Mayer, M.; Meyer, B. J. *Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6108-6117.

³⁵ (a) Claasen, B.; Axmann, M.; Meinecke, R.; Meyer, B. J. *Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 916-919. (b) Mari, S.; Serrano-Gomez, D.; Cañada, F. J.; Corbí, A. L.; Jimenez-Barbero, J. *Angew. Chem.* **2005**, 117, 300-302. (c) Mari, S.; Serrano-Gómez, D.; Cañada, F. J.; Corbí, A. L.; Jiménez-Barbero, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 296.

³⁶ van de Weerd, R.; Berbis, M. A.; Sparrius, M.; Maaskant, J. J.; Boot, M.; Paauw, N. J.; de Vries, N.; Boon, L.; Baba, O.; Cañada, F. J.; Geurtsen, J.; Jiménez-Barbero, J.; Appelmelk, B. J. *ChemBioChem* **2015**, 16, 977-989.

hélice de ADN para desarrollar una metodología STD que permitiera distinguir entre los tres principales modos de unión ligando-ADN: unión al surco menor, interacción electrostática externa, e intercalación.³⁷ Esta aproximación consiste en la obtención de dos juegos paralelos de espectros STD, realizados en las mismas condiciones, excepto por la frecuencia de irradiación *on resonance*. En un caso la saturación se genera con la irradiación selectiva a la frecuencia de la zona aromática, para saturar la zona de las bases púricas y pirimidínicas, y en el otro caso, la irradiación se realiza en la zona donde se encuentran las señales de la desoxirribosa. El porcentaje de saturación de los protones que muestran efecto STD se mide con respecto al espectro referencia adquirido irradiando en una zona donde no hay resonancias de la macromolécula (*off-resonance*). A continuación, se realiza un análisis comparativo de los dos pares de espectros. Por este motivo, este experimento en concreto fue llamado *Differential Frequency STD* (DF-STD).

La estructura del ADN se caracteriza por la presencia de las desoxirribosas, de la geometría de los enlaces fosfodiéster, y por la asimetría de la unión, mediante enlaces glicosídicos, de las bases heteroaromáticas al esqueleto de azúcares. Este hecho induce la formación de dos surcos diferentes, en caras opuestas de los pares de bases: el surco mayor y el surco menor. Los surcos tienen por tanto distintas geometrías y superficies electrostáticas generando centros de reconocimiento molecular susceptibles de reconocer moléculas distintas. En principio, sería de esperar que la unión de moléculas pequeñas al surco menor generase contactos fuertes con ambas regiones del mismo, siempre dependiendo de la estructura del ligando y de la anchura del surco. Por supuesto, esta varía en función de la secuencia concreta de oligonucleótidos esa región. En un modelo de B-ADN se observa que la localización de los átomos de hidrógeno de las desoxirribosas en relación con la estructura del surco es tal que el hidrógeno anomérico, H1', está cerca de la región interna del surco, mientras que los hidrógenos H4', H5' y H5'' apuntan hacia la zona externa del mismo (Figura 3.37). Así pues, pueden seleccionarse distintas zonas del espectro de ¹H-RMN, en las que aparecen las resonancias de estos protones del B-ADN. Por lo tanto, en principio, podría determinarse la cercanía espacial de las distintas regiones de un ligando a la región interior o exterior del surco menor.

En base a estas características estructurales, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado y optimizado un experimento DF-STD para la identificación de ligandos del surco menor del ADN.³⁸ En concreto, esta metodología ha permitido describir la orientación de los distintos residuos de las glico-oligoamidas neutras dentro del surco menor, en los complejos con los polímeros de ADN. Además, el método se validó empleando netropsina. En este experimento se realizan dos juegos distintos de experimentos STD, en las mismas condiciones experimentales, simplemente variando la frecuencia a la cual se irradia. Las frecuencias elegidas para

³⁷ Di Micco, S.; Bassarello, C.; Bifulco, G.; Riccio, R.; Gomez-Paloma, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 224-228.

³⁸ Sourd, F.; Muñoz, E.; Peñalver, P.; Badía, C.; del Villar-Guerra, R.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2435.

las irradiaciones selectivas corresponden a dos zonas diferentes, ambas dentro del surco menor: la región externa del surco menor donde se hallan los protones H4', H5' y H5'' de la desoxirribosa ($\delta = 4.5$ ppm) y la región interna del surco menor donde se encuentra el H1' ($\delta = 5.6$ ppm). En ambos casos, la irradiación *off-resonance* seleccionada fue $\delta = 50$ ppm. Una vez obtenidos los dos espectros STD, se hace un estudio comparativo entre ellos, evaluando los distintos efectos obtenidos en función de la zona de irradiación. De esta forma, se obtiene información sobre la cercanía de cada residuo del ligando a las diferentes regiones del surco menor del ADN. Este experimento puede aplicarse a otro tipo de ligandos, siempre y cuando estos no tengan señales de resonancia en las proximidades de la región espectral irradiada.

Se debe tener en consideración que el porcentaje de STD depende fundamentalmente del tiempo de saturación, de la constante de asociación y de las fracciones molares de ligando libre y enlazado. En general, si el tiempo de saturación es demasiado corto, no se generará suficiente transferencia de saturación para poder identificar claramente el epítipo de unión del ligando a la macromolécula. Por el contrario, si es demasiado largo, la magnetización puede ser transferida a lo largo de toda la molécula enlazada por difusión de espín, perdiéndose información localizada. Por lo tanto, en primera instancia, es fundamental hacer un estudio previo de las condiciones bajo las cuales se va a realizar el experimento. En esta tesis, para las glico-oligoamidas catiónicas se han probado diversos tiempos de saturación. El valor de tiempo de saturación que proporcionó una mejor relación señal/ruido y menor difusión de espín fue 400 ms.

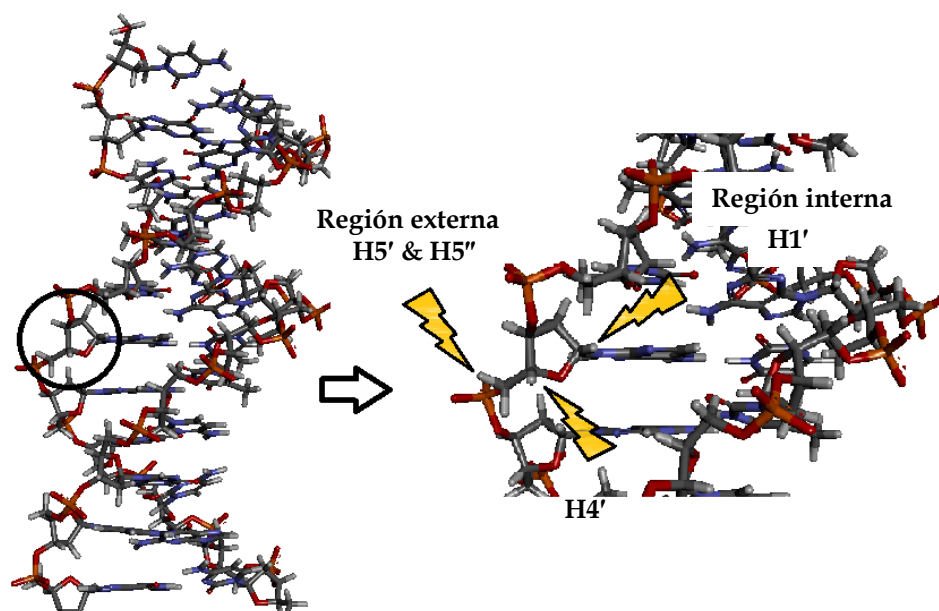


Figura 3.37 Estructura cristalina de B-DNA (NDB: 2M2C), donde se muestra la disposición de los protones H1', H4', H5' y H5'' del anillo de la desoxirribosa en la doble hélice.

Para la aplicación de este experimento es fundamental que, en las zonas de irradiación de protones del ADN, no haya ninguna resonancia del ligando estudiado, puesto que se obtendrían falsos efectos STD. Afortunadamente, el experimento puede

ser puesto en práctica con las glico-oligoamidas catiónicas, igual que sucedió con las neutras, sin que las resonancias del ligando se vean afectadas (Figura 3.38).

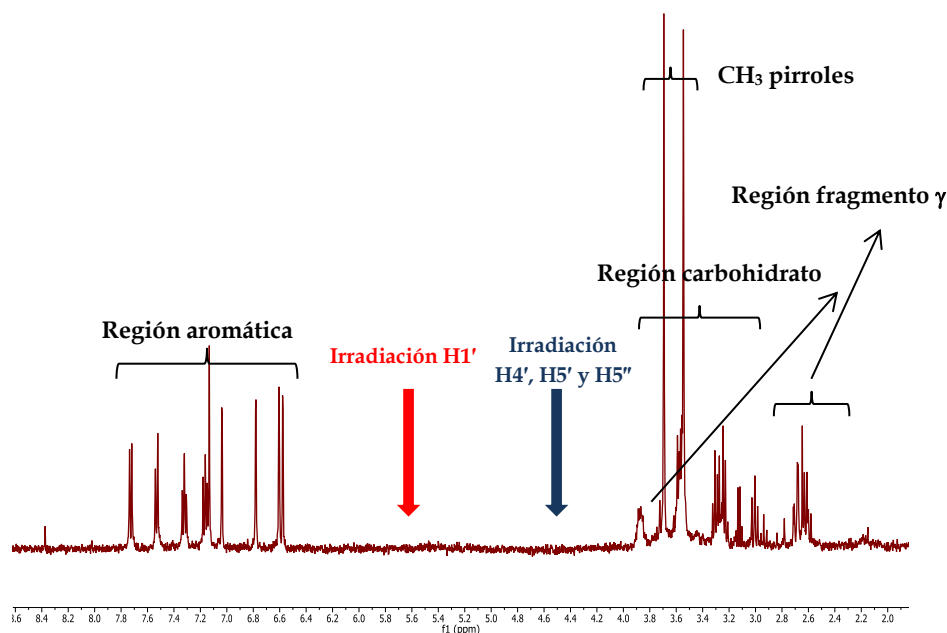


Figura 3.38 Espectro ^1H -RMN de $\beta\text{-D-Xil-Py-}\gamma[(\text{R})\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ donde se señalan las zonas espectrales correspondientes a los diferentes protones de desoxirribosa a las cuales se va a irradiar

A efectos prácticos, los valores de intensidad del espectro STD de cada protón se calculan respecto al espectro de referencia obtenido irradiando a 50 ppm (*off-resonance*). Seguidamente, se normalizan con referencia a la señal más intensa a la que se, otorga el porcentaje del 100 %. Por último, se comparan los valores normalizados obtenidos al irradiar la zona exterior del surco menor (4.5 ppm) y la interior (5.6 ppm). Para facilitar este análisis, es útil obtener un parámetro numérico que exprese la sensibilidad relativa de los protones del ligando a la perturbación surgida de cada tipo de irradiación. Por ello, se calcula el cociente I_f/I_d ; donde I_f es la intensidad de la señal STD de cada protón obtenida al irradiar al exterior del surco menor del ADN (4.5 ppm, protones H4' , H5' y H5''), e I_d es la intensidad de la señal STD de cada protón obtenida al irradiar al interior del surco menor (5.6 ppm, protón H1').

Los experimentos DF-STD con las glico-oligoamidas catiónicas se pusieron a punto empleando $\beta\text{-D-Xil-Py-}\gamma[(\text{R})\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ (**2**) y se realizaron tanto con Poly(dA-dT)_2 como con Poly(dG-dC)_2 . Al igual que sucedía en el caso de los experimentos tr-NOESY, esta es la primera vez que se realizan experimentos DF-STD con un complejo de una glico-oligoamida y un polímero de ADN compuesto exclusivamente por secuencias GC. Esto supone un avance a la hora de poder describir estructuralmente la interacción del carbohidrato con el surco menor de secuencias GC.

En primer lugar, se realizaron una serie de experimentos STD control con la glico-oligoamida catiónica **2** en ausencia de ADN, comprobando que el ligando no recibía saturación cuando se irradia en ambas zonas del surco menor de los polímeros de ADN (5.6 ppm y 4.5 ppm). Para todos los casos se encontró una saturación inferior al 6% y fue restada de las intensidades STD obtenidas para cada protón. En el anexo del

capítulo se pueden encontrar las tablas con todos los porcentajes STD además de los experimentos control.

En primer lugar se llevó a cabo el DF-STD en presencia de Poly(dA-dT)₂, con una relación molar ligando/ADN de 1/0.05 ([L] = 175 μM), en D₂O, tampón fosfato a 25 °C. La primera observación es que, en ambas irradiaciones, se observan claramente señales del ligando, lo cual indica que β-D-Xil-Py-γ[(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) se está uniendo al surco menor del polímero de ADN (Figura 3.39). Además, hay transferencia de saturación a toda la molécula, incluyendo el carbohidrato, lo que significa que nuestro ligando está completamente dentro del surco menor del polímero de ADN.

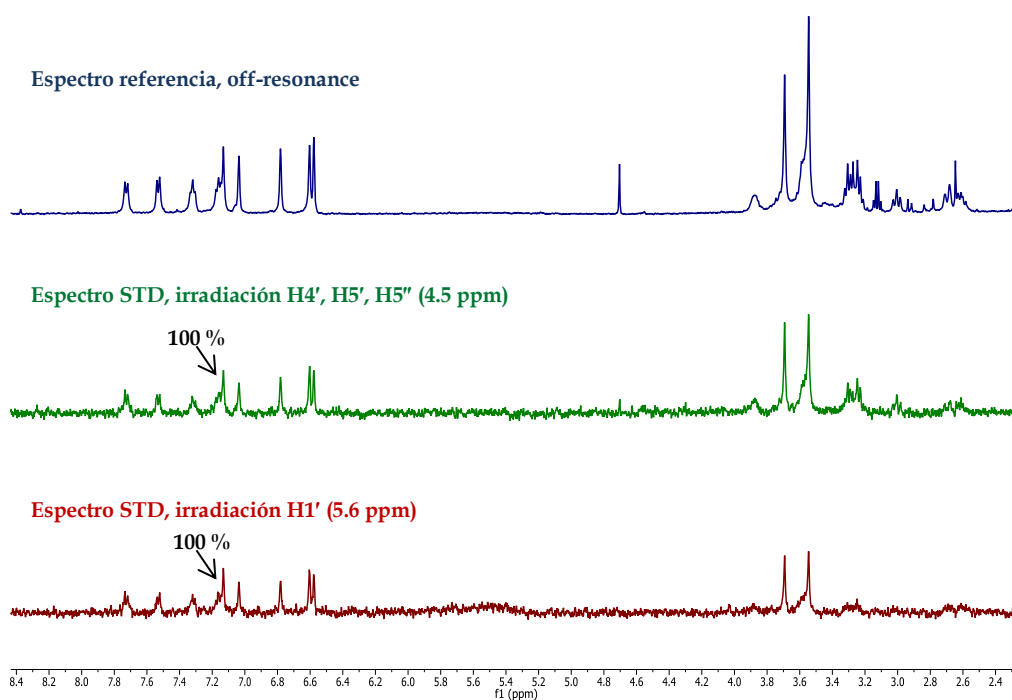


Figura 3.39 Espectros DF-STD del complejo β-D-Xil-Py-γ[(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) /Poly(dA-dT)₂ (relación molar 1/0.05, [L] = 175 μM) en D₂O, tampón fosfato a 25 °C. Espectro referencia con irradiación off-resonance, espectro azul. Espectro STD (ampliado 5×) irradiando a los protones H4', H5', H5'' de la desoxirribosa (región externa ADN), espectro verde. Espectro STD (ampliado 5×) irradiando al protón H1' de la desoxirribosa (región interna ADN), espectro rojo. En ambos espectros se marca con el 100%, aquellas señales que presentan la máxima saturación, Ind-3.

La inspección de los dos espectros STD revela distintos grados de saturación para diferentes partes de la molécula en las dos irradiaciones. En la irradiación de la región interna del surco menor (5.6 ppm), se distingue una mayor transferencia de saturación a los residuos aromáticos comparado con la zona del carbohidrato, sugiriendo una cercanía mayor de esta parte de la molécula al interior del surco menor del ADN. También cabe destacar el menor porcentaje de STD observado en los metilos de los pirroles en esta irradiación, que indica que se encuentran orientados a la región externa del surco (Figura 3.40, B). Por el contrario, la irradiación de la región externa del surco menor (4.5 ppm), lleva asociada una elevada transferencia de saturación generalizada a toda la molécula (Figura 3.40, A). Por lo tanto, una conclusión importante es que hay

transferencia de saturación a toda la molécula, incluyendo en carbohidrato, situándolo dentro del surco menor del ADN.

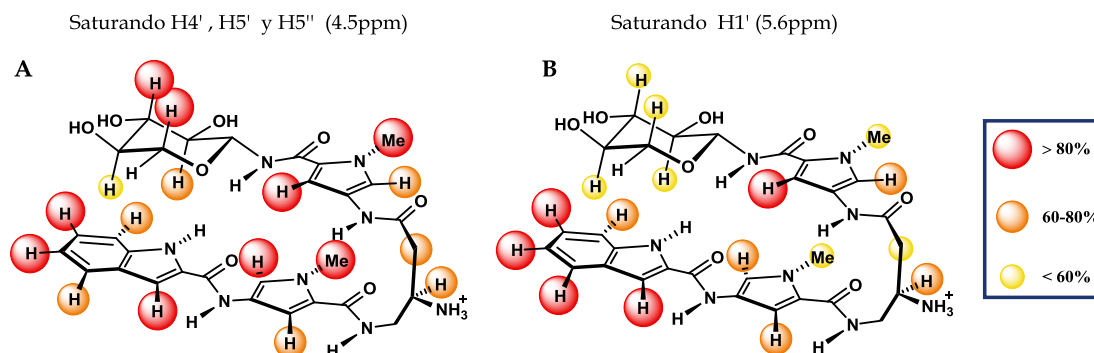


Figura 3.40 Epítomos obtenidos de los datos STD de ambas irradiaciones selectivas. Figura A, irradiación en la región externa del surco menor del Poly(dA-dT)₂ (4.5 ppm). Figura B, irradiación en la región interna del surco menor del Poly(dA-dT)₂ (5.6 ppm). Los colores representan las intensidades STD de cada protón relativas a la intensidad STD de la señal más saturada. Rojo, por encima del 80 %; naranja, entre un 60 y un 80 % y amarillo por debajo del 60%.

El cálculo del parámetro numérico (I_f/I_d) que expresa la sensibilidad relativa de los protones del ligando a la perturbación surgida de cada tipo de irradiación, permitió describir la orientación de la molécula dentro del surco menor del Poly(dA-dT)₂ (ver tabla en el anexo del capítulo). El criterio escogido para determinar si un residuo se orienta hacia dentro o hacia fuera del surco menor se evalúa en cada caso teniendo en consideración los valores máximos y mínimos del cociente I_f/I_d . Es importante realizar un estudio comparativo exhaustivo de estos valores entre los distintos protones, para poder llegar a conclusiones estructurales. Desde un punto de vista conservador, se optó por estimar que la diferencia en porcentaje entre las dos regiones del ADN irradiadas debía de ser de al menos un 10%. En la siguiente Figura 3.41 se muestran en azul aquellos protones que dieron mayor porcentaje STD al irradiar la región externa del surco menor del ADN (H4', H5' y H5'' de la desoxirribosa) y que tienen un valor de I_f/I_d mayor de 1.1. En color rojo se muestran los protones que dieron mayor efecto STD, al irradiar la zona interna del surco menor del ADN (H1' de la desoxirribosa), con valores de I_f/I_d menores o iguales a 1.

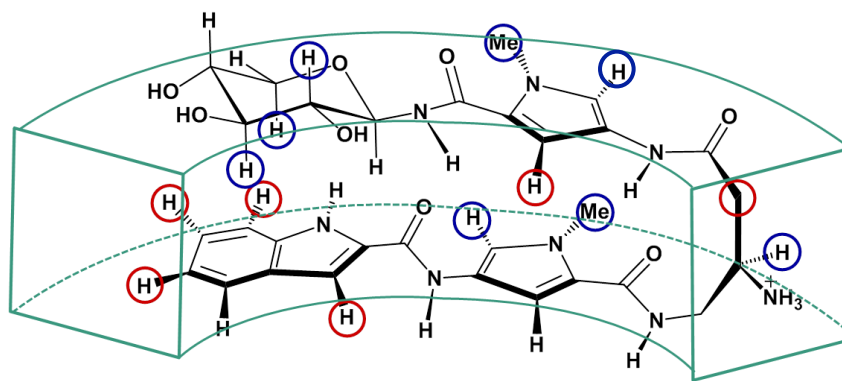


Figura 3.41 Resultados de los experimentos DF-STD de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) con Poly(dA-dT)₂. En azul, los protones orientados hacia la región externa del surco menor. En rojo, los protones orientados hacia la zona interior del surco menor.

Los resultados obtenidos sugieren que la conformación adoptada por la glico-oligoamida catiónica de xilosa en la forma unida es igual a la encontrada en su forma libre, definiéndose dos arcos diferentes. La zona del arco metilo está próxima a la región externa del surco, ya que las mayores intensidades de los protones Py-5^A, Me^A y Me^B del espectro STD, obtenido de saturar H1', y los valores del cociente I_f/I_d por encima de 1.1, así lo indican. De esta forma, se generaría también el arco NH, donde se encontrarían los Py-3, que se orientaría hacia la región interna del surco. Esto se corrobora con la mayor perturbación de la señal Py-3^B al irradiar la zona de H4', H5' y H5'' del ADN y con el valor de I_f/I_d , por debajo de 1. También los protones del indol se encontrarían cercanos a la región interna del surco. Esta conformación es análoga a la encontrada en el estudio de los complejos con ADN de las glico-oligoamidas neutras, los miméticos de factores de transcripción de nuestro grupo y las oligoamidas de Dervan.

En cuanto al fragmento γ se refiere, se observa que el protón γ^b , sufre una mayor perturbación al irradiar la zona externa del surco, por tanto su valor I_f/I_d es mayor que 1.1 y lo sitúa en la región externa del surco. Una posible explicación a estos datos experimentales, es la orientación forzada del grupo amino hacia la zona más externa del surco, debido a impedimentos estéricos con el surco menor.³⁹ Por el contrario, los protones γ^c y $\gamma^{c'}$, poseen valores I_f/I_d por debajo de 1, localizándose en la región interna del surco. Desafortunadamente, no fue posible la evaluación de algunas señales (protones γ^a y $\gamma^{a'}$) por su solapamiento con otras señales.

Por último, en el caso del carbohidrato, tampoco ha sido posible evaluar todas las señales del carbohidrato debido a su solapamiento en el caso de H5 o a su desaparición con la supresión del agua como es el caso de H1. Las señales que se observan son las correspondientes a H2, H3, H4 y H5', todas ellas con unos valores I_f/I_d superiores a 1.1, sugiriendo una cercanía a la región externa del surco menor del Poly(dA-dT)₂. La falta de datos de los otros protones impide definir con exactitud la orientación de todos los centros del carbohidrato dentro del surco menor. No obstante, es importante resaltar

³⁹ Dose, C.; Farkas, M. E.; Chenoweth, D. M.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6859-6866.

que la mera transferencia de saturación pone de relevancia la proximidad del carbohidrato al surco menor del ADN.

Como ya se ha mencionado, la novedad en este estudio es que el experimento también se llevó a cabo con Poly(dG-dC)₂. Las condiciones que se emplearon para este experimento con secuencias GC son similares a las optimizadas para secuencias AT (relación molar ligando/ADN de 1/0.1, [L] = 160 μM, en D₂O, tampón fosfato a 25 °C). Al igual que en el caso del complejo con Poly(dA-dT), lo primero que se aprecia es que hay transferencia de saturación a toda la molécula en ambas irradiaciones (espectro DF-STD en el anexo del capítulo). Esto indica la formación del complejo β-D-Xil-Py-γ[(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2)/ADN, también con secuencias con pares de bases GC, tal y como habían indicado las titulaciones. No obstante, en general, se aprecia una menor transferencia de saturación en este caso si se compara con el experimento con Poly(dA-dT).

Nuevamente, en la irradiación de la región interna del surco menor (Figura 3.42, B), se distingue una mayor transferencia de saturación a los residuos aromáticos comparado con la zona del carbohidrato, sugiriendo una cercanía mayor de esta parte de la molécula al interior del surco menor del ADN. Si se comparan los porcentajes STD entre los distintos residuos aromáticos, se observa una mayor transferencia de saturación al indol comparado con los pirroles, lo cual no sucedía en el caso del complejo con Poly(dA-dT)₂. Como se ha comentado en la introducción, es conocido que los metil-pirroles son selectivos de secuencias AT⁴⁰ y que el origen de esta selectividad reside en el impedimento estérico que hay entre el grupo amino exocíclico de la guanina y el protón Py-3 del pirrol en secuencias GC. Este hecho justificaría la diferencia de saturación entre los pirroles y el indol, quedando los pirroles más alejados del interior del surco menor. Por otro lado, al irradiar la zona externa del surco del Poly(dG-dC)₂, se observa mayor transferencia de saturación al carbohidrato, sugiriendo la cercanía de este a la región más externa del surco.

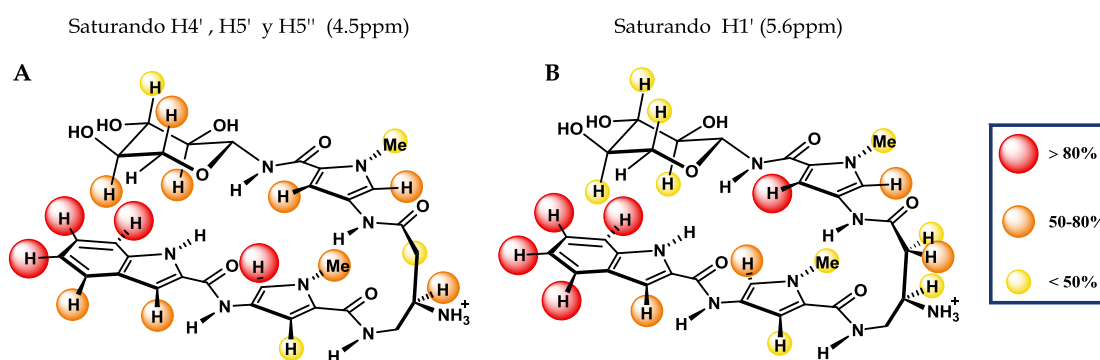


Figura 3.42 Epítomos obtenidos de los datos STD de ambas irradiaciones selectivas. Figura A, irradiación en la región externa del surco menor del Poly(dG-dC)₂ (4.5 ppm). Figura B, irradiación en la región interna del surco menor del Poly(dG-dC)₂ (5.6 ppm). Los colores representan las intensidades STD de cada protón relativas a la intensidad STD de la señal más saturada. Rojo, por encima del 80 %; naranja, entre un 50 y un 80 % y amarillo por debajo del 50%.

⁴⁰ White, S.; Szewczyk, J. W.; Turner, J. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Nature* **1998**, 391, 468-471.

De nuevo, para realizar un análisis riguroso de los datos obtenidos del DF-STD se calculó el cociente de intensidades STD I_f/I_d (tabla en el anexo del capítulo) del complejo con Poly(dG-dC)₂. La mayoría de protones del indol muestran valores por debajo de 1, que indican claramente que este residuo se orienta hacia la región interna del surco menor (Figura 3.43). Al igual que sucedía con Poly(dA-dT)₂, en el caso de los pirroles, la orientación del pirrol A está también claramente definida, ubicando el Me^A y Py-5^A hacia fuera del surco, dejando a Py-3^A orientado hacia dentro. Para los protones del pirrol B, los valores obtenidos del parámetro I_f/I_d están por debajo de 1, sugiriendo una cercanía general al interior del surco. No obstante, dentro de esos valores, se puede deducir una orientación exterior de Me^B y Py-5^B al contrario que Py-3^B, situado hacia dentro. Por tanto se vuelve a adoptar la misma conformación descrita anteriormente para Poly(dA-dT)₂, con un arco exterior definido por los metilos y uno interior marcado por los NH.

Para el fragmento γ se vuelve a observar como en el caso de Poly(dA-dT)₂, que el protón γ^b , sufre una mayor perturbación al irradiar la zona externa del surco. Su valor I_f/I_d es mayor que 1.1 y lo sitúa en la región externa. Por el contrario, los protones γ^c y γ^c' , poseen valores I_f/I_d muy por debajo de 1, localizándolos en la región interna del surco.

En cuanto al carbohidrato, la orientación es similar a la adoptada en el caso del complejo con Poly(dA-dT)₂. Se obtienen valores de I_f/I_d muy por encima de 1, indicando su cercanía a la región externa del surco menor del Poly(dG-dC)₂, exceptuando al H3, que con un valor de 1.1

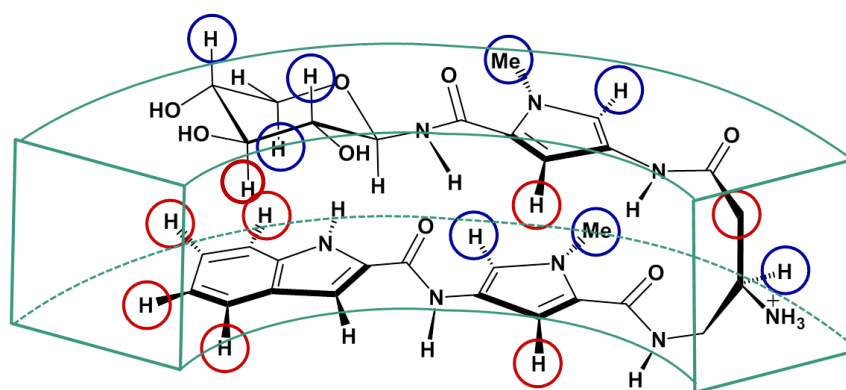


Figura 3.43 Resultados de los experimentos DF-STD de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind con Poly(dG-dC)₂. En azul, los protones orientados hacia la región externa del surco menor. En rojo, los protones orientados hacia la zona interior del surco menor.

En resumen, el análisis de los resultados estructurales por RMN (TR-NOESY y DF-STD) de los complejos con poly(dA-dT)₂ y poly(dG-dC)₂ ha permitido deducir la orientación global de las glico-oligoamidas catiónicas dentro del surco menor y confirmar su unión a de los polímeros de ADN. Se adopta una conformación plegada y curva, análoga a la observada en el estado libre, con los dos arcos definidos: el arco NMe orientado al exterior del surco menor y el NH orientado hacia el interior. Como era previsible, parece que el grupo amino del fragmento γ se orienta hacia el exterior

del surco. En cuanto al carbohidrato, no ha sido posible deducir una orientación concreta, no obstante se ha certificado su cercanía e introducción en el surco menor del ADN. Aun así, la realización y optimización de los experimentos DF-STD con todo tipo de secuencias de ADN, abre la posibilidad de estudiar en más profundidad la interacción de las glico-oligoamidas catiónicas tanto con secuencias AT como con secuencias GC. La posibilidad de acercar las glico-oligoamidas catiónicas a secuencias GC y realizar estudios estructurales de esos complejos, permite ampliar el estudio de las características estructurales clave en el reconocimiento carbohidrato-ADN.

3.5 Conclusiones generales del capítulo

En primer lugar, se ha calculado la solubilidad tanto de la glico-oligoamida catiónica β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) como de la neutra β -D-Man-Py- γ -Py-Ind (**35**) y se ha certificado la mejora de la solubilidad de los derivados catiónicos, llegando a duplicarse con respecto a los derivados neutros.

Se ha realizado un estudio conformacional por RMN de la glico-oligoamida catiónica β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) en agua y se ha comparado con los resultados previos obtenidos para su glico-oligoamida análoga neutra β -D-Xil-Py- γ -Py-Ind (**1**). Gracias a las diferencias de desplazamientos químicos entre β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) y su modelo hebra carbohidrato β -D-Xil-Py-NHAc (**5**), a los experimentos NOESY y ROESY y a los experimentos de temperatura variable, se ha podido confirmar la existencia en disolución un porcentaje de conformación plegada de la glico-oligoamida catiónica de xilosa. Esta conformación plegada se caracteriza por ser además curva y generar dos arcos: un arco delimitado por los NH de la estructura y otro definido por los metilos de los pirroles. En cuanto al carbohidrato, no ha sido posible deducir una selección de cara determinada con respecto al indol. Lo que sí ha sido posible definir es la configuración Z del enlace amidoglicosídico, gracias al valor de la constante de acoplamiento y a los nOes intra-hebra encontrados.

En base al apantallamiento generalizado de casi todos los protones del carbohidrato (en su comparación con el modelo β -D-Xil-Py-NHAc (**5**)), la imposibilidad de obtener nOes inter-hebra carbohidrato indol, y la complicada detección en H₂O de algunos NHs de la molécula por RMN, la conclusión que se extrae es la existencia de una mezcla conformacional en disolución acuosa.

En cuanto a la comparación con su análogo **1**, la conformación adoptada por **2** en disolución acuosa en el estado libre es similar en ambas moléculas. Los resultados previos de nuestro grupo de investigación indican una conformación plegada curva, sin poder definir la cara del carbohidrato orientada hacia el indol.

También se han realizado estudios de interacción por RMN con distintos polímeros de ADN, Poly(dA-dT)₂ y Poly(dG-dC)₂.

En cuanto a los estudios de interacción con Poly(dA-dT)₂, se ha demostrado, a nivel cualitativo, la mejora de afinidad de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) respecto de su análoga neutra **1**, gracias a la realización de titulaciones seguidas por ¹H-RMN.

También se comparó cualitativamente la afinidad por Poly(dA-dT)₂ y Poly(dG-dC)₂. Por primera vez se logra en nuestro grupo de investigación un vector que logra acercar el carbohidrato a secuencias compuestas exclusivamente por pares GC. Se evaluó cualitativamente su selectividad de secuencia realizando una titulación con Poly(dG-dC)₂. Se demostró la preferencia de la glico-oligoamida catiónica por secuencias de pares de bases AT.

Además, el experimento de competición entre β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) y netropsina, ligando específico del surco menor del ADN, con Poly(dA-dT)₂ puso de manifiesto la coincidencia de sitios de unión por parte de ambos ligandos.

Por último, se llevó a cabo un estudio conformacional de los complejos, desde el punto de vista del ligando, mediante experimentos TR-NOESY y DF-STD. El análisis de estos datos indicó que la conformación adoptada por la glico-oligoamida catiónica de xilosa en los complejos con Poly(dA-dT)₂ y con Poly(dG-dC)₂ era análoga a la hallada en el estado libre. Una conformación plegada en forma de horquilla y curva, en la que el arco NH se orienta hacia la región interna del surco menor del ADN y el arco NMe se sitúa en la región externa del mismo.

A pesar de no poder definir con detalle la orientación del carbohidrato en el surco, los experimentos STD tanto con Poly(dA-dT)₂ como con Poly(dG-dC)₂ mostraron transferencia de saturación a toda la molécula incluyendo el carbohidrato, indicando la proximidad del azúcar al surco menor del ADN en ambas secuencias.

Cabe destacar, como principal novedad en este capítulo, la posibilidad de acceder a secuencias de ADN compuestas exclusivamente por pares de bases GC, gracias a las nuevas glico-oligoamidas catiónicas. De este modo, se abre la posibilidad de acercar el carbohidrato tanto a secuencias AT como a secuencias GC, pudiendo ampliarse el estudio de los requerimientos clave que rigen el reconocimiento molecular de carbohidratos-ADN.

3.6 Experimental section

3.6.1 General

DMSO was purchased from Merck. Poly(dA-dT)₂ (CAS Number 86828-69-5) and Poly(dG-dC)₂ (CAS Number 90385-88-9) were purchased from Sigma-Aldrich as a lyophilized sodium salt, and were used without further purification. D₂O was procured from Sigma-Aldrich and the H₂O for NMR experiments was freshly filtered milliQ grade. 3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt (TSP) was purchased from Sigma-Aldrich. Netropsin was procured from Sigma-Aldrich. The 0.2 µm nylon filters were provided by Symta. Phosphate buffer (PBS) 10 mM, pH = 7.2, was made mixing the appropriate amounts of Na₂HPO₄ (6.1 mM) and NaH₂PO₄ (3.9 mM), in water. The pH was adjusted with either a diluted aqueous solution of NaOH or a diluted aqueous solution HCl. The pH of aqueous solutions was determined with a Crimson basic-20 pH meter equipped with a Crimson 5029 glass electrode.

3.6.2 Solubility assay

Solubility measurements of β-D-Man-Py-γ-Py-Ind (**35**) and β-D-Man-Py-γ[(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) were performed on an analytic high performance liquid chromatograph (HPLC) Waters equipped with a Waters Alliance 2695 separations module and Waters 2996 Photo Diode Array (PDA) Detector. The following HPLC conditions were used: H₂O/CH₃CN (98:2 → 5:95) (HCO₂H, 0.1%), flow rate of 1 mL/min, UV detection using diode array (λ = 230–400 nm).

Standard curves were generated from sequential dilutions from a stock solution 500 µM of each glyco-oligoamide, cationic and neutral, affording final substrate solutions of 250, 175, 100, 50, 25 µM. HPLC measurements were carried out three times for each concentration. The average of the three HPLC peak areas for each concentration was plotted versus concentration of the sample.

Solubility measurement was performed under equilibrium conditions at pH 7.2. Approximately 1 mg of powder of the test compound was dissolved in 100 µL of phosphate buffer at pH 7.2. This solution was vortex for 1 minute and then, 100 µL more were added to the suspension. The resulting solution was shaken for 48 h until equilibrium is reached. Subsequently, the solutions were centrifuged, the supernatant was separated and filtered with Nylon filter. The concentration of the compound in the filtrate was determined by HPLC analysis. In order to get a concentration value within the range of the standard curve, dilution of the filtrate was performed. For the neutral glyco-oligoamide it was necessary to dilute 10 times the filtrate and for the cationic analogue 30 times.

3.6.3 Sample preparation for NMR experiments

NMR sample solutions from 500 μM to 100 μM were prepared from a stock solution of cationic glyco-oligoamide 10^{-3} M in a mixture of MeOH and H_2O . Aliquots of different volumes from this stock solution were transferred to several Eppendorf and the resulting samples were lyophilized. The chosen transferred volume should be the appropriate so when the dried solid is dissolved again in 0.5 mL, the desired concentration is reached.

Additionally, phosphate buffer (PBS) dried samples were also prepared. 1mL volume samples of PBS 10 mM were prepared in eppendorfs and lyophilized to dryness.

In order to be able to calculate the final concentration of the samples, 3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- d_4 acid sodium salt (TSP) was used as internal reference (20 μM).

The procedure to prepare the NMR samples is shown in Figure 3.1. 10 μL of a stock solution (10^{-2} M) of TSP in water were added to 5 mL of deuterium oxide or H_2O , giving a final solution of 20 μM TSP solution in D_2O . 1mL of that solution was added to a lyophilized PBS sample and vortex for 3-5 minutes, so the pH of the sample is adjusted around 7.2. Finally, 0.5 mL of that solution were added to the lyophilized cationic glyco-oligoamide sample. Depending on the solubility of the sample, the solution was sonicated for 5 minutes.

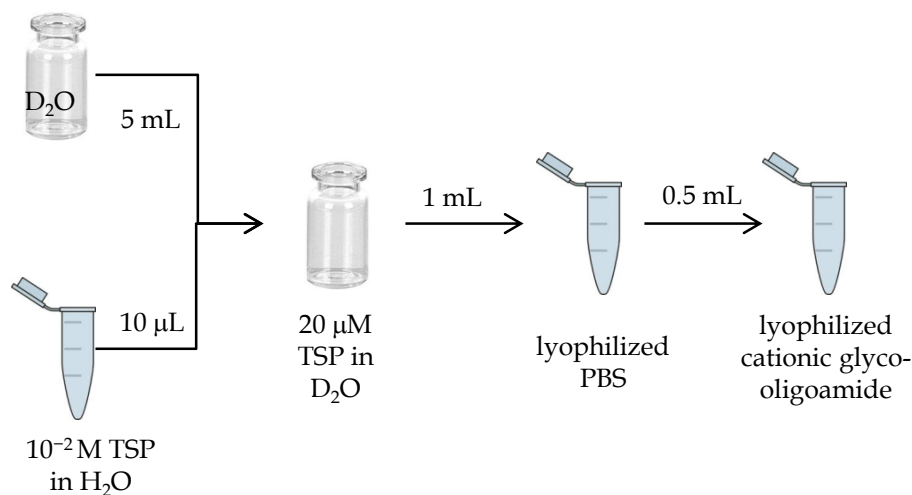


Figure 3.1 General procedure to prepare NMR samples

3.6.4 NMR structural studies

The NMR study of the cationic glyco-oligoamides in water solution was performed using 500 μM samples in D_2O . Standard 2D-methods, such as COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, ROESY and NOESY experiments were employed to assign the ^1H -NMR signals, using Varian System 500 MHz.

NOESY and ROESY (mixing times 400-600 ms) experiments in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10) as well as in H_2O using a D_2O capillary as external reference were recorded on Bruker Avance 500 MHz NMR spectrometer. NMR spectra were recorded at 5 $^\circ\text{C}$ and at 25 $^\circ\text{C}$.

Monodimensional ^1H -NMR comparative study between cationic glyco-oligoamide (2) and single strand carbohydrate model (5) was performed on Bruker Avance 500 MHz spectrometer. Water suppression was achieved by using an excitation sculpting sequence (zgesgp).

Variable temperature NMR experiments of cationic glyco-oligoamide (2) and carbohydrate model compound (5) in $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetone}$ (90:10) were carried out on a Bruker DMX500 spectrometer. The ^1H -NMR spectroscopic experiments were carried out at concentrations of 300-500 μM for both compounds depending on the solubility in water. The spectra were recorded at four different temperatures in the range 0 to -15 $^\circ\text{C}$.

3.6.5 NMR interaction studies

All NMR interaction studies with DNA polymers were performed on a Bruker Avance 500 MHz spectrometer. DNA concentration measurements were carried out on a UV/Visible Perkin-Elmer Lambda 35 spectrophotometer, and concentrations were expressed in base pair.

DNA sample preparation

DNA solutions were prepared by adding a certain volume of 20 μM TSP in D_2O solution directly to the DNA vial. DNA solutions were gently shaken for 30 minutes. DNA concentrations were determined spectrophotometrically using $\epsilon_{260\text{nm}} = 13200 \text{ M}(\text{bp})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for Poly(dA-dT)₂ and $\epsilon_{254\text{nm}} = 16800 \text{ M}(\text{bp})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for Poly(dG-dC)₂. Purity of DNA solutions was checked by UV-visible spectroscopy from the ratio $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, which was found to be in the right range (1.8 - 2.0), suggesting that both solutions are essentially free of protein or RNA.

NMR Titration

Cationic glyco-oligoamide solution was prepared as explained above. First, in order to calculate concentration of the sample by comparison with TSP signal, a ^1H -NMR spectrum was recorded. The following procedure (Figure 3.2) was designed to keep constant glyco-oligoamide concentration all along the NMR titration. Once the real concentration was calculated, cationic glyco-oligoamide solution was poured into an Eppendorf. Half of the glyco-oligoamide solution (250 μL) was poured in an

Eppendorf, diluted by half with 250 μL of 20 μM TSP solution in D_2O and placed back into the NMR tube. Again a ^1H -NMR spectrum was recorded to check that concentration is half of the previous one.

Then, the other half of the glyco-oligoamide solution (250 μL) was placed in another Eppendorf and 250 μL of DNA solution were added. As a consequence, glyco-oligoamide solution was diluted by half. This final solution with a mixture of DNA and ligand will be added progressively to the NMR tube. In this way, with every DNA addition, glyco-oligoamide is added also, and ligand concentration remains constant.

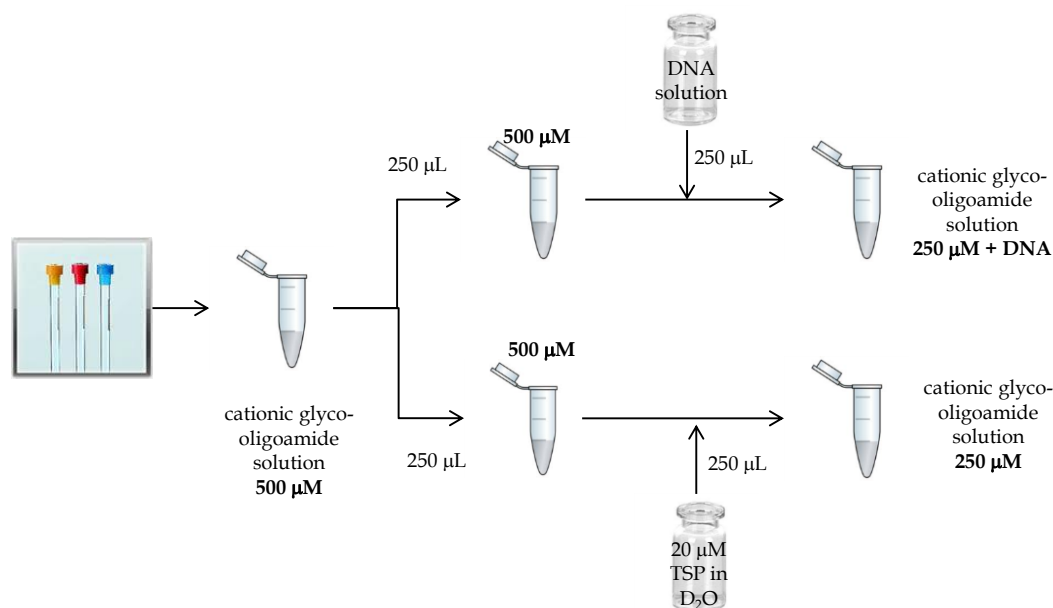


Figure 3.2 General procedure for NMR titration sample preparation

Subsequently, increasing amounts of the titrant DNA solution were added while keeping constant ligand concentration. For every addition a ^1H NMR spectrum was recorded in the same conditions (64 scans, $d_1=5\text{s}$, 25°C), and line broadening was monitored until complete disappearance of the proton signals.

NMR Competition experiment with Netropsin

Once the titration experiment is finished, so the resonances of the cationic glyco-oligoamide **2** have disappeared from the ^1H -NMR spectrum, 20 μL of netropsina solution 10^{-2}M in buffer phosphate D_2O solution were added to the NMR tube and another ^1H -NMR spectrum was recorded to monitor the evolution of the signals. Upon sequential additions of netropsin solution, reappearance of the glyco-oligoamide **2** resonances was monitored by recording ^1H -NMR after each addition.

NMR Competition experiment between neutral glyco-oligoamide **1** and cationic glyco-oligoamide **2**

For this competition experiment, a ^1H -NMR spectrum of the buffer solution containing both ligands **1** and **2** in the same concentration (300 μM) was recorded. Then

increasing amounts of poly-(dA-dT)₂ (1.96 mM bp) were added and ¹H-NMR spectra were recorded after each addition. Signal intensities of the ligand showing higher affinity for the DNA decrease more quickly.

TR-NOESY experiments

The bound-state NMR experiments were carried out once the spectra of the free ligand was clear but slightly broadened (Ligand/DNA ratio, 1/0.1 for Poly(dG-dC)₂ and 1/0.05 for Poly(dA-dT)₂). TR-NOESY experiments for the bound ligand were performed on a Avance Bruker 500 MHz spectrometer with saturation of the residual H₂O signal or with the Watergate pulse sequence. TR-NOESY experiments were recorded in D₂O at 25 °C, and H₂O: D₂O (90:10) in this case at 5 °C to minimize the hydrogen/deuterium exchange. The mixing time used for both cases was 200 ms. Negative and intense NOEs (which are indicative of binding to the macromolecule) were found in all of the experiments; these were in contrast with the weak NOEs observed in the free state conformation for cationic glyco-oligoamide **2**.

DF-STD experiments

STD experiments for the bound ligands were performed on a 500 MHz AVANCE Bruker spectrometer using D₂O as a solvent. Either no water suppression or the Watergate sequence was used depending on the obtained signal/noise ratio without solvent suppression. A ligand/receptor molar excess of up to 1/0.1 was used for the best STD effects.

The STD effects of the individual protons were calculated for each compound relative to a reference spectrum with off-resonance saturation at $\delta=50$ ppm. 128 scans were recorded for the reference STD spectrum. The best duration of the saturation pulse, the power of the selective Gaussian pulse, and the recycling delay were optimized to get the best possible signal/noise ratio with no spin diffusion within a reasonable experimental time. The final experiments were performed at 298 K with a recycling delay of 4 s, an acquisition time of around 1.3 s, and a saturation time of 400 ms. The saturation was accomplished by using 8 Gaussian shaped pulses of 49 ms each, separated by 1 ms, with an approximate power of $\gamma B=20$ Hz. Two saturation frequencies were selected: $\delta=4.50$ ppm (to hit the H4', H5', and H5'' region of deoxyribose in DNA) and $\delta=5.60$ ppm (to hit the H1' region in DNA). Control experiments performed without the DNA receptor showed that no effect was observed in the ligand protons when the H1' region ($\delta=5.60$ ppm) in DNA was chosen, whereas less than 6% saturation was observed for some protons (MeA and MeB), at on-resonance saturation at $\delta=4.50$ ppm. The intensities due to saturation observed in the control experiments were subtracted from the intensities observed in the presence of DNA to calculate the STD intensities. The intensity of each peak in the STD spectra was standardized in relation to a proton resonance the intensity of which was assigned to be 100. The normalization of the signal intensity was done relative to Py-3 and Ind-3. Both sets of data treatment rendered identical conclusions. Such conclusions were

obtained by comparing the normalized value of each proton resonance intensity upon irradiation of the outer or inner region of the DNA groove.

4. CAPÍTULO 4

GLICO-OLIGOAMIDAS CATIONICAS CON CARBOHIDRATOS CON CENTROS DADORES DE ENLACE DE HIDRÓGENO

4.1 Introducción y antecedentes

Uno de los objetivos que se persigue en el proyecto en el cual se enmarca esta tesis es el estudio de redes de enlace de hidrógeno (EH) intramoleculares en agua que generan centros de enlace cooperativos y la participación de estos en procesos de reconocimiento molecular carbohidrato-ADN. La estrategia seguida en este capítulo es la introducción de carbohidratos que posean centros dadores de enlace de hidrógeno cooperativos en las glico-oligoamidas catiónicas para estudiar su posible influencia en procesos de reconocimiento molecular con los distintos polímeros de ADN. Por ello se ha sintetizado la glico-oligoamida catiónica que contiene β -D-Manosa como carbohidrato. Se espera que la unión amidoglicosídica en posición β permita al NH5 formar un enlace de hidrógeno unidireccional intramolecular generando un anillo de cinco miembros NH-5...OH₂. Para lograr generar el enlace de hidrógeno es fundamental que el enlace amidoglicosídico esté en posición β y que el OH₂ del carbohidrato se encuentre en posición axial, para que haya distancia de enlace de hidrógeno. Este enlace polarizado en un único sentido NH-5→OH₂, podría permitir que OH₂ se comporte como un posible centro dador de EH cooperativo con un aceptor externo en un proceso intermolecular, dada la naturaleza dual dador/aceptor de EH de los grupos hidroxilos (Figura 4.1).

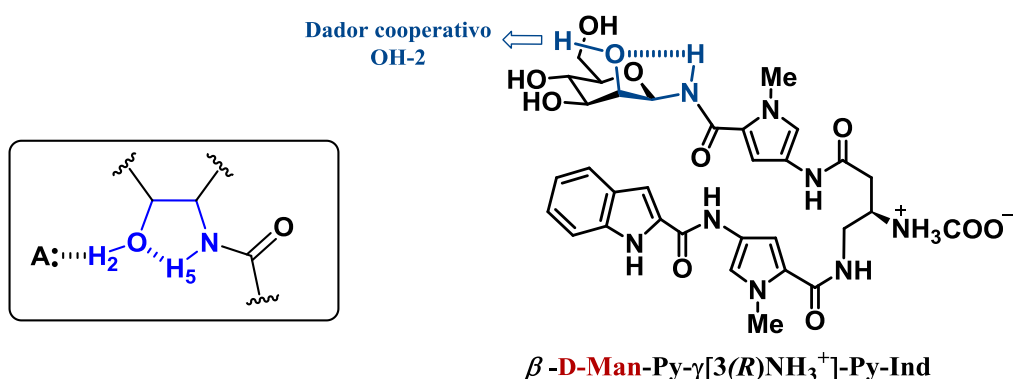


Figura 4.1 Red cooperativa direccional de enlace de hidrógeno que da lugar a un anillo de cinco miembros y hace que OH-2 pueda comportarse como dador de enlace de hidrógeno con un aceptor externo.

Además, también se ha sintetizado la glico-oligoamida catiónica que contiene al enantiómero de β -D-Manosa de la serie L, la β -L-Manosa (Figura 4.2). De esta forma, se han obtenido dos glico-oligoamidas catiónicas diastereómeras (**3** y **4**), debido a que contienen cada una manosa de la serie D y L respectivamente y el centro quiral (R) en el fragmento γ . Con ello se pretende explorar la influencia de la quiralidad del carbohidrato en la conformación del estado libre y las posibles implicaciones que puede tener esto en el estado asociado. La finalidad es poder emplear como herramienta de reconocimiento molecular la quiralidad de los carbohidratos y del grupo amino en el fragmento γ para poder dirigir los centros cooperativos de enlace de hidrógeno cooperativos hacia una orientación particular o hacia la contraria.

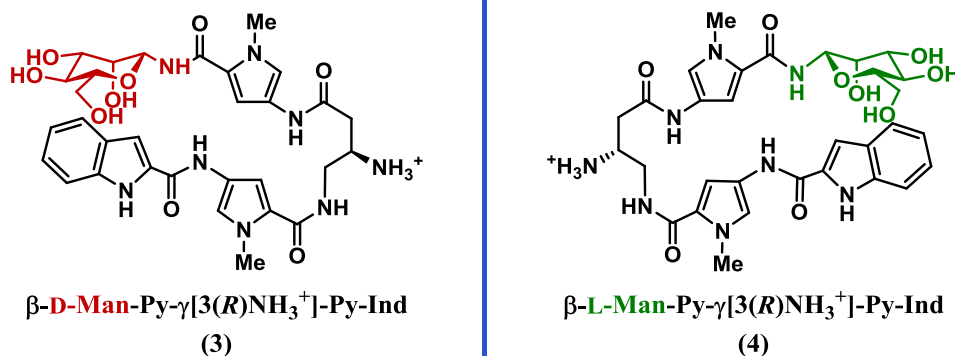


Figura 4.2 Glico-oligoamidas catiónicas diastereómeras derivadas de D-manosa y L-manosa (3 y 4)

En el grupo, se ha llevado un estudio similar con glico-oligoamidas neutras conteniendo carbohidratos de la serie D y L. No obstante, la introducción de un nuevo centro quiral en γ , añade un grado de complejidad extra al estudio de estas moléculas. Las posibles conformaciones en disolución acuosa de estas glico-oligoamidas catiónicas y su correspondiente unión al ADN, estarán originadas por interacciones supramoleculares (CH- π , enlaces de hidrógeno y π - π) las cuales estarán influidas por la quiralidad del carbohidrato, del grupo amino en el fragmento γ y por el propio plegamiento de la molécula.

4.2 Estudios conformacionales de las glico-oligoamidas catiónicas que contienen D-manosa 3 y L-manosa 4 en el estado libre en agua: determinación de la conformación de horquilla y caracterización del enlace de hidrógeno intramolecular NH5...OH2

Como ya se ha visto en el capítulo anterior, la nueva glico-oligoamida catiónica de xilosa **2** presenta un equilibrio conformacional en disolución acuosa en el que coexisten un determinado número de conformaciones diferentes, tanto plegadas como abiertas. Se ha podido detectar la existencia de un alto porcentaje de conformación plegada en forma de horquilla, estabilizada por interacciones CH- π y π - π , que también era característica de las glico-oligoamidas neutras. Por lo tanto, cabe esperar encontrar una conformación análoga en el caso de las glico-oligoamidas catiónicas β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) y β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**). Para corroborarlo, se llevarán a cabo diversos estudios de RMN, para caracterizar dicha conformación.

En este caso, es importante recalcar que estas glico-oligoamidas catiónicas tienen un diseño concreto en el azúcar, para que se propicie la formación de una red cooperativa de enlace de hidrógeno generando centros dadores de enlace de hidrógeno cooperativos que puedan participar en un proceso intermolecular. La configuración del OH2 ha variado con respecto a la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2**, en donde el OH2 está en posición ecuatorial, mientras que en D y L-manosa está en posición axial, condición imprescindible para que se dé el enlace de hidrógeno intramolecular. Esta diferencia puede tener implicaciones a nivel conformacional que afecten al estudio

posterior del enlace de hidrógeno. Por este motivo, es necesario realizar un estudio conformacional en profundidad previo a la caracterización del enlace de hidrógeno intramolecular ($\text{NH}_5 \cdots \text{OH}_2$) que confirme su existencia en agua.

Por último, para completar el estudio conformacional de las glico-oligoamidas catiónicas y la caracterización del enlace de hidrógeno intramolecular, se contrastarán todos los datos experimentales con estudios teóricos DFT.

4.2.1 Asignación del espectro ^1H -RMN de las glico-oligoamidas de D-manosa (3) y L-manosa (4) catiónicas en disolución acuosa a 25 °C y a -15 °C

4.2.1.1 Asignación los espectros ^1H -RMN de 3 y 4 en D_2O a 25 °C

Todos los estudios conformacionales de las glico-oligoamidas catiónicas 3 y 4 se han realizado mediante el empleo de técnicas de RMN, por lo que en primer lugar, se ha llevado a cabo la asignación de sus espectros ^1H -RMN en D_2O a 25°C. Los espectros son diferentes por ser diastereómeros (Figura 4.3), las principales diferencias se encuentran en el fragmento γ , en la zona aromática de los pirroles y en algunos protones del carbohidrato. Esta asignación fue posible gracias al uso de espectros tanto monodimensionales como bidimensionales. En el apéndice de nomenclatura se puede encontrar los protones a los cuales hacen referencia los códigos empleados.

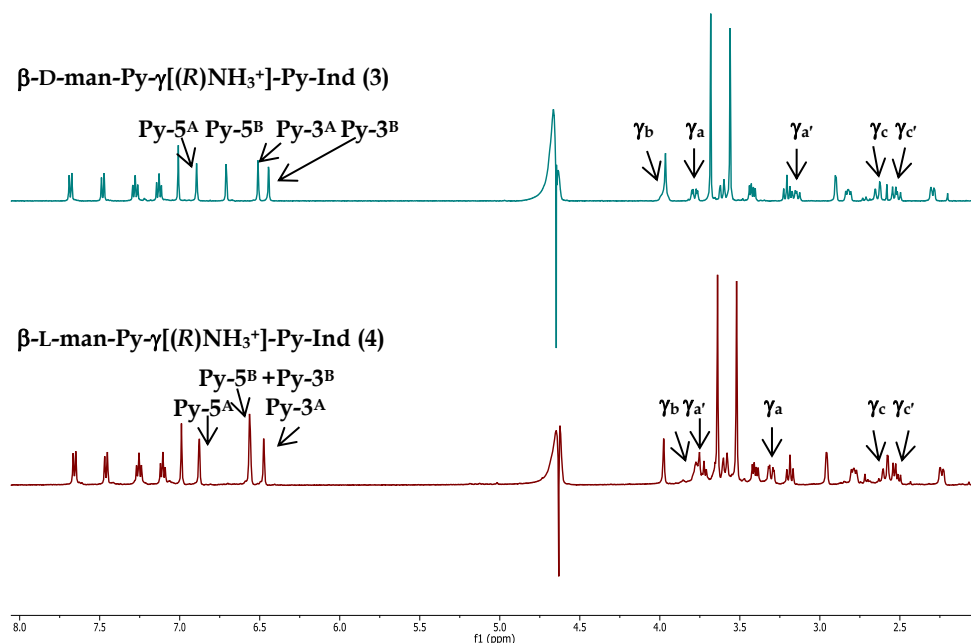


Figura 4.3 Espectros ^1H -RMN de las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa 3 (espectro en verde, arriba) y de L-manosa 4 (espectro en rojo, debajo) en D_2O a 25°C

En la tabla mostrada a continuación (Tabla 4.1) se observan las asignaciones correspondientes a ambas glico-oligoamidas catiónicas, D y L-manosa (3 y 4). El protocolo seguido en la asignación ha sido el mismo empleado con el derivado catiónico de D-xilosa. Los espectros COSY y NOESY en D_2O permitieron la asignación de las resonancias del anillo indol. Gracias al COSY, también se identificaron los

protones de los pirroles: Py-5, Py-3 y Me, sin embargo no se pudo determinar qué señales pertenecían al pirrol A y cuales al B. Para poder asignar inequívocamente estas señales, y además, detectar las resonancias de los protones NH intercambiables, también se realizaron los experimentos en H₂O a 5°C.

Tabla 4.1 Desplazamiento químico (± 0.01 ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento de las resonancias de los protones aromáticos y los protones de la cadena γ en el espectro de ¹H-RMN de las glico-oligoamidas catiónicas (3 y 4) en D₂O a 25 °C. Referencia TSP-d₄ a 0.00ppm.

		β -D-Man-Py- γ [(R)NH ₃ ⁺]-Py-Ind 3	β -L-Man-Py- γ [(R)NH ₃ ⁺]-Py-Ind 4
INDOL	Ind-4	7.66 (d, J = 8.0 Hz)	7.66 (d, J = 7.9 Hz)
	Ind-7	7.46 (d, J = 8.2 Hz)	7.46 (d, J = 7.9 Hz)
	Ind-6	7.26 (dd, J = 8.2, 7.0 Hz)	7.25 (dd, J = 7.9, 7.9 Hz)
	Ind-5	7.11 (dd, J = 8.0, 7.0 Hz)	7.11 (dd, J = 7.9, 7.9 Hz)
	Ind-3	6.99 (s)	6.99 (s)
PIRROL	Py-5 ^A	6.87 (d, J = 1.9 Hz)	6.88 (d, J = 1.9 Hz)
	Py-5 ^B	6.69 (d, J = 1.9 Hz)	6.57-6.55 (m)
	Py-3 ^B	6.43 (d, J = 1.9 Hz)	6.57-6.55 (m)
	Py-3 ^A	6.49 (d, J = 1.9 Hz)	6.47(d, J = 1.9 Hz)
	Me ^A	3.66 (s)	3.64 (s)
	Me ^B	3.54 (s)	3.52 (s)
CADENA γ	γ a	3.76 (dd, J = 14.2, 5.1 Hz)	3.30 (dd, J = 13.7, 3.8 Hz)
	γ a'	3.13 (dd, J = 14.2, 9.5 Hz)	3.70-3.80 (m)
	γ b	3.98-3.92 (m)	3.70-3.80 (m)
	γ c	2.62 (dd, J = 14.7, 2.5 Hz)	2.59 (dd, J = 15.1, 2.8 Hz)
	γ c'	2.50 (dd, J = 14.7, 10.1 Hz)	2.52 (dd, J = 15.1, 8.1 Hz)

Como se observa en la tabla, no hay grandes diferencias de desplazamientos químicos entre las regiones aromáticas de los espectros de ambas glico-oligoamidas catiónicas. Las señales de los protones del indol coinciden, no sucede así con las señales de los pirroles, que varían ligeramente. Para el caso del derivado de L-manosa (4), las señales de los dos protones de uno de los pirroles están solapadas, cosa que no sucede en el caso del derivado de D-manosa (3). Donde más difieren, es en la región correspondiente a las señales del fragmento γ . En el espectro de la glico-oligoamida catiónica de D-manosa (3), la señal correspondiente al protón γ b está más

desapantallada (3.98-3.92 ppm) que en el espectro de la glico-oligoamida catiónica de L-manosa (**4**) (3.70-3.80 ppm). Además, en el espectro del derivado de D-manosa, los protones diastereotópicos γ a y γ a' pudieron ser asignados gracias a sus constantes de acoplamiento. Se determinó que la señal a 3.76 ppm con una constante de acoplamiento de 5.1 Hz correspondía al protón γ a, en posición *sin* con respecto al protón γ b y que la señal a 3.13 ppm con una constante de acoplamiento de 9.5 Hz correspondía al protón γ a', en posición *anti* con respecto a γ b. Por el contrario, en el caso del derivado de L-manosa, para esos mismos protones, la señal más desapantallada (3.70-3.80 ppm) solapada parcialmente con γ b, fue atribuida al protón γ a', y la señal a 3.30 ppm con una constante de acoplamiento de 3.8 Hz, fue asignada al protón γ a. Estas variaciones podrían estar indicando una distinta colocación del fragmento γ en cada diastereómero. Por último, los protones γ c y γ c' fueron identificados también en base a sus constantes de acoplamiento. En este caso, no se observó una variación tan significativa entre ambas glico-oligoamidas catiónicas.

La asignación de los protones del carbohidrato (Tabla 4.2), fue posible principalmente gracias al experimento COSY en D₂O a 25°C.

Tabla 4.2 Desplazamiento químico (± 0.01 ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento de las resonancias de los protones correspondientes al carbohidrato en el espectro de ¹H-RMN de las glico-oligoamidas (**3** y **4**) en D₂O a 25 °C. Referencia TSP-d₄ a 0.00ppm.

		β -D-Man-Py- γ [(R)NH ₃ ⁺]-Py-Ind 3	β -L-Man-Py- γ [(R)NH ₃ ⁺]-Py-Ind 4
	CARBOHIDRATO		
	H1	3.98-3.92 (m)	3.98 (s.a.)
	H6	3.59 (dd, <i>J</i> = 12.5, 2.2 Hz)	3.59 (dd, <i>J</i> = 12.5, 2.3 Hz)
	H6'	3.40 (dd, <i>J</i> = 12.5, 6.0 Hz)	3.40 (dd, <i>J</i> = 12.5, 6.1 Hz)
	H4	3.19 (dd, <i>J</i> = 9.8, 9.8 Hz)	3.19 (dd, <i>J</i> = 9.8, 9.8 Hz)
	H2	2.88 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz)	2.96 (d, <i>J</i> = 3.4 Hz)
	H5	2.80 (ddd, <i>J</i> = 9.8, 6.1, 2.2 Hz)	2.81-2.75 (m)
	H3	2.28 (<i>J</i> = 9.8, 2.5 Hz)	2.24 (dd, <i>J</i> = 9.7, 3.4 Hz)

Se detectaron y asignaron las resonancias de los NHs de los compuestos **3** y **4** en H₂O/D₂O (Tabla 4.3). Gracias a la multiplicidad de las señales, se pudieron asignar directamente NH5 y NH3. El protón NH5 se acopla con el protón anomérico del carbohidrato dando lugar a un doblete, y el NH3 se acopla con los dos protones γ a y γ a', obteniéndose un triplete. Estas asignaciones fueron cruciales para a continuación, poder distinguir inequívocamente que resonancias correspondían al pirrol A y cuales al B, mediante la detección de nOes entre NH3/Py-3^A y NH5/Py-3^B. El NH1 se asignó en ambos casos, en base a su desplazamiento químico y por la existencia nOe NH1/Ind-7. En cuanto a la detección de NH2 y NH4 aparecen como singletes anchos y en

ocasiones no son detectables. En el caso de la glico-oligoamida catiónica de D-manosa **3**, es posible observar NH4 y NH2 en H₂O/D₂O (9:1) a 5 °C como singletes muy anchos, e identificar el NH4 gracias a un nOe débil con γ c y γ c'. Para la glico-oligoamida de L-manosa **4**, no fue posible detectar el NH2.

Tabla 4.3 Desplazamiento químico (± 0.01 ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento de las resonancias de los protones NH en el espectro de ¹H-RMN de las glico-oligoamidas (**3** y **4**) en H₂O a 5 °C. Referencia TSP-d₄ a 0.00ppm.

		β -D-Man-Py- γ [(R)NH ₃ ⁺]-Py-Ind 3	β -L-man-Py- γ [(R)NH ₃ ⁺]-Py-Ind 4
PROTONES NH	NH1	10.93 (s)	10.97 (s)
	NH2	9.99 (s.a.)	- ^a
	NH4	9.89 (s.a.)	9.96 (s.a.)
	NH3	8.10 (t, J = 6.5 Hz)	8.08 (t, J = 6.1 Hz)
	NH5	7.46 (d, J = 8.9 Hz)	7.48 (d, J = 8.9 Hz)

^a No fue posible detectar la señal de este protón en H₂O/D₂O a 5 °C

4.2.1.2 Asignación del espectro ¹H-RMN de **3** y **4** en H₂O/acetona-d₆ (90:10) a -15 °C

Con el fin de realizar la posterior caracterización del enlace de hidrógeno intramolecular NH5...OH2 en medio acuoso por RMN, también se realizó la asignación de las resonancias de los protones de las glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4** a baja temperatura -15 °C en mezcla de H₂O/acetona-d₆ (90:10).¹ La asignación previa en D₂O ha sido de gran utilidad para la caracterización de los protones no intercambiables. Para la asignación de los protones intercambiables NH y OH, han sido necesarios experimentos bidimensionales TOCSY y NOESY realizados en H₂O/acetona-d₆ (90:10) a -15 °C. En general, la detección de los protones intercambiables en H₂O por RMN, especialmente en el caso de los OH, no es trivial y requiere una búsqueda de condiciones adecuada. En este caso, hemos sido capaces de detectar todos los protones intercambiables y de asignarlos. Este paso ha sido fundamental para caracterizar el enlace de hidrógeno intramolecular NH5...OH2, proporcionando información estructural muy valiosa en el estudio de nuestras moléculas.

¹ En el caso de β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind **3** la muestra se congeló a -15 °C, por lo que la caracterización y el resto de experimentos de RMN a baja temperatura se realizaron a -10 °C.

Tabla 4.4 Desplazamiento químico (± 0.01 ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento de las resonancias de los protones aromáticos y los protones de la cadena γ en el espectro de ^1H -RMN de las glico-oligoamidas catiónicas (3 y 4) en $\text{H}_2\text{O}/\text{acetona-}d_6$ (90:10) a -10°C y -15°C respectivamente. Referencia TSP- d_4 a 0.00ppm.

		$\beta\text{-D-Man-Py-}\gamma[(\text{R})\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ 3	$\beta\text{-L-man-Py-}\gamma[(\text{R})\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ 4
INDOL	Ind-4	7.81 (d, $J = 8.6$ Hz)	7.82 (d, $J = 8.7$ Hz)
	Ind-7	7.61 (d, $J = 8.6$ Hz)	7.61 (d, $J = 8.7$ Hz)
	Ind-6	7.41 (d, $J = 7.8$ Hz)	7.41 (d, $J = 7.8$ Hz)
	Ind-5	7.26 (d, $J = 7.8$ Hz)	7.26 (d, $J = 7.8$ Hz)
	Ind-3	7.16 (s)	7.15 (s)
PIRROL	Py-5 ^A	7.04 (s)	7.03 (s)
	Py-5 ^B	6.87 (s)	6.75 (s)
	Py-3 ^B	6.59 (s)	6.71-6.68 (m)
	Py-3 ^A	6.71 (s)	6.71-6.68 (m)
	Me ^A	3.85 (s)	3.83 (s)
	Me ^B	3.73 (s)	3.71 (s)
CADENA γ	γa	4.03-3.94 (m)	3.47 (dd, $J = 10.5, 4.5$ Hz)
	$\gamma\text{a}'$	3.28-3.21 (m)	4.03-3.98 (m)
	γb	4.23-4.15 (m)	4.03-3.98 (m)
	γc	2.80 (d, $J = 14.7$)	2.79-2.69 (m)
	$\gamma\text{c}'$	2.72-2.64 (m)	2.79-2.69 (m)

Tabla 4.5 Desplazamiento químico (± 0.01 ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento de las resonancias de los protones del carbohidrato en el espectro de ^1H -RMN de las glico-oligoamidas catiónicas (3 y 4) en $\text{H}_2\text{O}/\text{acetona-}d_6$ (90:10) a -10°C y -15°C respectivamente. Referencia TSP- d_4 a 0.00ppm.

		$\beta\text{-D-Man-Py-}\gamma[(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ 3	$\beta\text{-L-Man-Py-}\gamma[(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ 4
CARBOHIDRATO	H1	4.03-3.94 (m)	3.96 (d, $J = 9.0$ Hz)
	H6	3.80-3.75 (m)	3.78-3.73 (m)
	H6'	3.60-3.53 (m)	3.58-3.52 (m)
	H4	3.33 (dd, $J = 11.6, 11.6$ Hz)	3.35-3.26 (m)
	H2	2.98 (s.a.)	2.98 (s.a.)
	H5	3.00-2.90 (m)	2.93-2.85 (m)
	H3	2.28-2.23 (m)	2.15-2.07 (m)

Las asignaciones de los protones NH (Tabla 4.6) y OH (Tabla 4.7), han sido posibles gracias a experimentos bidimensionales TOCSY y NOESY realizados en $\text{H}_2\text{O}/\text{acetona-}d_6$ (90:10) a -15°C . Los protones NH3 y NH5 se asignaron en base a su multiplicidad y constantes de acoplamiento y la existencia de un nOe NH1/Ind-7 permitió la identificación del NH1, al igual que $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$. En cuanto a la caracterización de NH2 y NH4, fue clave la detección de diversos nOes: NH2 /Ind-3 y NH2/Py-3^A permitieron identificar el NH2, finalmente los nOes NH4/Py-3^B y NH4/ γc y $\gamma\text{c}'$ llevaron a la asignación de NH4.

Tabla 4.6 Desplazamiento químico (± 0.01 ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento de las resonancias de los protones NH en el espectro de ^1H -RMN de las glico-oligoamidas (3 y 4) en $\text{H}_2\text{O}/\text{acetona-}d_6$ (90:10) a -10°C y -15°C respectivamente. Referencia TSP- d_4 a 0.00ppm.

		$\beta\text{-D-Man-Py-}\gamma[(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ 3	$\beta\text{-L-Man-Py-}\gamma[(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ 4
PROTONES NH	NH1	11.10 (s)	11.13 (s)
	NH2	10.14 (s)	10.15 (s)
	NH4	10.07 (s.a.)	10.08 (s)
	NH3	8.27 (t, $J = 6.8$ Hz)	8.23 (t, $J = 5.6$ Hz)
	NH5	7.47 (d, $J = 8.4$ Hz)	7.50 (d, $J = 8.9$ Hz)

En cuanto a los protones de los hidroxilos, su asignación se ha realizado con la ayuda del espectro TOCSY a baja temperatura. Se ha logrado observar y asignar todos los OH del carbohidrato. En la Figura 4.4 se muestra la región del espectro del carbohidrato, que contiene las señales de los OH y los respectivos picos de cruce de todos ellos con sus CH correspondientes.

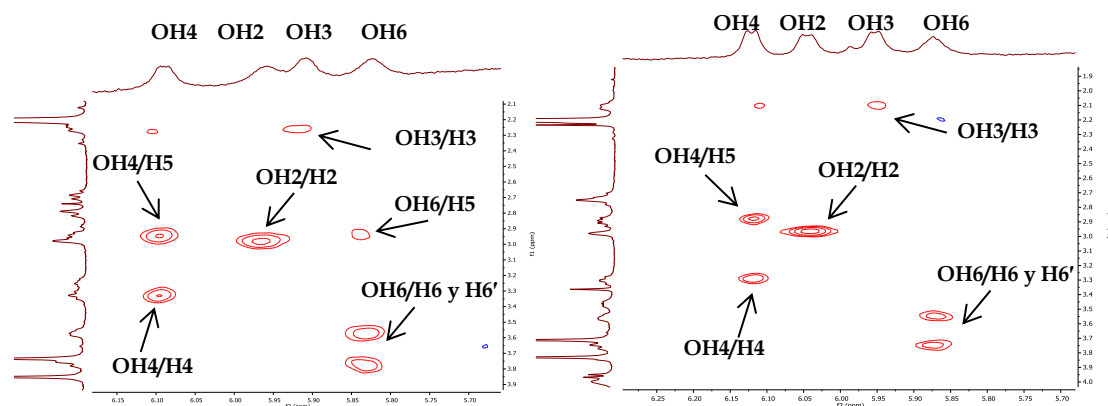


Figura 4.4 Ampliación de los espectros TOCSY de β -D-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (3) (espectro de la izquierda) y β -L-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (4) (espectro de la derecha) en H_2O /acetona- d_6 a $-10^\circ C$ y $-15^\circ C$ respectivamente

En la Tabla 4.7 se muestran los desplazamientos químicos de todas las resonancias de los hidroxilos. En el caso de la glico-oligoamida catiónica de D-manosa **3** no ha sido posible medir las constantes de acoplamiento debido a que las señales aparecen como singletes anchos. Sin embargo para el derivado de L-manosa **4** si fue posible medirlas.

Tabla 4.7 Desplazamiento químico (± 0.01 ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento de las resonancias de los protones OH del carbohidrato en el espectro de 1H -RMN de las glico-oligoamidas (3 y 4) en H_2O /acetona- d_6 (90:10) a $-10^\circ C$ y $-15^\circ C$. Referencia TSP- d_4 a 0.00ppm.

		β -D-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind 3	β -L-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind 4
PROTONES NH	OH4	6.09 (s.a.)	6.12 (d, $J = 6.7$ Hz)
	OH2	5.96 (s.a.)	6.04 (d, $J = 6.9$ Hz)
	OH3	5.91 (s.a.)	5.95 (d, $J = 6.1$ Hz)
	OH6	5.82 (s.a.)	5.90-5.85 (m)

Por último, también se asignaron las señales del modelo de hebra carbohidrato de D-manosa **6** (β -D-Man-Py-NHAc) en las mismas condiciones, ya que será necesario para los estudios comparativos posteriores.

Tabla 4.8 Desplazamiento químico (± 0.01 ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento de las resonancias de los protones del modelo hebra carbohidrato de D-manosa, en el espectro de ^1H -RMN en $\text{H}_2\text{O}/\text{acetona-}d_6$ (90:10) a -15°C . Referencia TSP- d_4 a 0.00ppm.

		$\beta\text{-D-Man-Py-NHAc}$ 6
NH	NH4	10.01 (s)
	NH5	8.18 (d, $J = 8.7$ Hz)
OH	OH4	6.40 (d, $J = 6.4$ Hz)
	OH2	6.38-6.34 (m)
	OH3	6.38-6.34 (m)
	OH6	6.02 (s.a.)
PIRROL	Py-5 ^B	7.19 (d, $J = 1.9$ Hz)
	Py-3 ^B	6.84 (d, $J = 8.7$ Hz)
	Me ^B	3.83 (s)
CARBOHIDRATO	H1	5.35 (s.a.)
	H2	4.04 (s.a.)
	H6	3.97-3.90 (m)
	H6'	3.80 – 3.72 (m)
	H3	3.80 – 3.72 (m)
	H4	3.68-3.61 (m)
	H5	3.56-3.49 (m)
	COCH ₃	2.11 (s)

4.2.2 Estudio conformacional para la determinación de la estructura de horquilla de las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa (3) y L-manosa (4)

Una vez realizada la asignación de las resonancias de ambas glico-oligoamidas catiónicas, $\beta\text{-D-Man-Py-}\gamma[(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ (3), $\beta\text{-L-Man-Py-}\gamma[(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ (4) y el modelo $\beta\text{-D-Man-Py-NHAc}$ (6), se realizó un estudio conformacional en agua con objeto de confirmar la presencia de un porcentaje de conformación plegada en horquilla y establecer la disposición del carbohidrato respecto del resto de la molécula. Para determinar la conformación de ambas glico-oligoamidas en el estado libre en disolución acuosa por RMN se siguió el protocolo puesto a punto en nuestro laboratorio. Este consiste en: el estudio de la variación de los desplazamientos

químicos de las glico-oligoamidas catiónicas con respecto a sus modelos de hebra carbohidrato, experimentos de temperatura variable, análisis del valor de la constante de acoplamiento del NH5 y la realización de espectros NOESY.

4.2.2.1 *Estudio comparativo de los desplazamientos químicos de RMN de las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa (3) y L-manosa (4) con respecto a su hebra carbohidrato (6)*

La presencia de un porcentaje importante de conformación plegada en disolución debería reflejarse en una diferencia de desplazamiento químico notable entre las resonancias de los protones de las glico-oligoamidas catiónicas y las de los protones de los modelos de hebra carbohidrato. Por tanto el estudio comparativo de los desplazamientos químicos en agua de ambos diastereómeros **3** y **4** con su respectivo modelo hebra carbohidrato **6**, puede dar información sobre el efecto que tiene la aproximación de la hebra indol sobre la hebra carbohidrato.

Se han registrado espectros ^1H -RMN de β -D-Man-Py- $\gamma[(R)\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind (**3**), β -L-Man-Py- $\gamma[(R)\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind (**4**) y del modelo carbohidrato β -D-Man-Py-NHAc (**6**) en D_2O a 25 °C y también en una mezcla de H_2O /acetona- d_6 (90:10) a -15 °C. El estudio se ha realizado con estas dos condiciones diferentes, obteniéndose el mismo resultado. No obstante, los experimentos realizados en H_2O /acetona- d_6 (90:10) a -15 °C, proporcionan más información por la detección de los protones intercambiables, por esta razón a continuación solo se detallará el análisis de estos datos a baja temperatura. La siguiente Tabla 4.9 contiene la variación de los desplazamientos químicos del fragmento del carbohidrato de ambas glico-oligoamidas catiónicas de D y L-manosa (**3** y **4**) con respecto a su modelo hebra carbohidrato (**6**).

Tabla 4.9 Diferencia de desplazamientos químicos de los protones correspondientes al carbohidrato entre el modelo de carbohidrato (6) y las glico-oligoamidas catiónicas (3) y (4) ($\Delta\delta = \delta_{\beta\text{-D-Man-Py-NHAc}} - \delta_{\beta\text{-D-Man-Py-}\gamma\text{[(R)NH}_3^+\text{]}\text{-Py-Ind}}$)

		$\Delta\delta$ (ppm)	
		$\beta\text{-D-Man-Py-}\gamma\text{[(R)NH}_3^+\text{]}\text{-Py-Ind}$ 3	$\beta\text{-L-Man-Py-}\gamma\text{[(R)NH}_3^+\text{]}\text{-Py-Ind}$ 4
CARBOHIDRATO	H1	1.37	1.39
	H2	1.06	1.06
	H3	1.51	1.65
	H4	0.31	0.33
	H5	0.58	0.64
	H6	0.16	0.18
	H6'	0.19	0.21
OH	OH4	0.31	0.28
	OH2	0.4	0.32
	OH3	0.45	0.41
	OH6	0.2	0.15

En general, se observan variaciones de los desplazamientos químicos para todas las señales del carbohidrato, hacia campo alto en ambas glico-oligoamidas catiónicas, lo cual indicaría la presencia de un porcentaje elevado de conformación plegada en disolución acuosa. Sin embargo, a simple vista, es llamativa la gran diferencia que hay entre los valores de los desplazamientos químicos inducidos de los distintos protones, oscilando entre 0.16 ppm hasta 1.51 ppm (Figura 4.5). Un análisis más detallado de estos datos muestra que para ambas glico-oligoamidas **3** y **4**, los protones que poseen desplazamientos químicos inducidos más marcados son H1, H2, H3 y H5. De entre estos protones cabe destacar especialmente el apantallamiento sufrido por H1 (1.37 ppm), H2 (1.06 ppm) y H3 (1.51 y 1.65 ppm para cada derivado). Lo relevante de este comportamiento es que todos ellos se encuentran en la cara α del carbohidrato. Mientras que los protones H4, H6 y H6', presentes en la cara β del carbohidrato, sufren una menor perturbación.

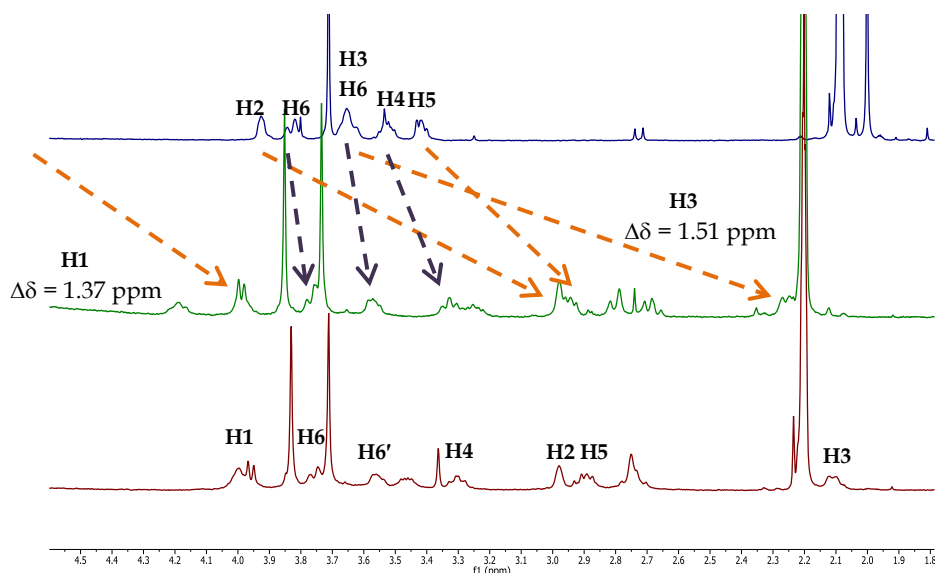


Figura 4.5 Comparativa de las regiones del carbohidrato de los espectros de ^1H -RMN de la glico-oligoamida catiónica β -D-Man-Py- $\gamma[(R)\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind (3) (espectro verde), β -L-Man-Py- $\gamma[(R)\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind (4) (espectro rojo) y su modelo hebra carbohidrato β -D-Man-Py-NHAc (6) (espectro azul) en H_2O /acetona a -15°C

Este patrón de desplazamientos químicos inducidos observado tanto en el derivado de D-manosa como en el derivado de L-manosa, sugiere la existencia de una conformación mayoritaria, donde hay una selección de la cara α del carbohidrato hacia el indol (Figura 4.6). Los protones presentes en esa cara del carbohidrato estarían orientados directamente hacia el cono de apantallamiento del indol, generando un desplazamiento muy pronunciado de sus resonancias hacia campo alto. El origen de este fenómeno podría encontrarse en la presencia de interacciones CH- π favorables entre esa cara del carbohidrato y el indol, aunque sorprende el hecho de que el H2 en ecuatorial, vea más afectado su desplazamiento que el H5 en posición axial. Otro factor que puede influir a favor de la selección de la cara α es la existencia del OH2 en posición axial en la cara β , ya que es conocido que estos grupos hidroxilos en axial en el anillo de piranosa generan interacciones desfavorables para la formación de complejos carbohidrato/anillo aromático.² El comportamiento de ambas glico-oligoamidas catiónicas es muy similar, salvo por que, en general los desplazamientos químicos inducidos en β -L-Man-Py- $\gamma[(R)\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind, son ligeramente mayores.

² (a) Nishio, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 13873. (b) J. L. Asensio, A. Ardá, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 946-954. (c) Terraneo, G.; Potenza, D.; Canales, A.; Jiménez-Barbero, J.; Baldrige, K. K.; Bernardi, A. J. *Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2890. (d) Wimmerová, M.; Kozmon, S.; Nečasová, I.; Mishra, S. K.; Komárek, J.; Koča, J. *PLoS One* **2012**, 7, No. e46032. (e) Ramírez-Gualito, K.; Alonso-Ríos, R.; Quiroz-García, B.; Rojas-Aguilar, A.; Díaz, D.; Jiménez-Barbero, J.; Cuevas, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 18129. (f) Ke, C.; Destecroix, H.; Crump, M. P.; Davis, A. P. *Nat. Chem.* **2012**, 4, 718.

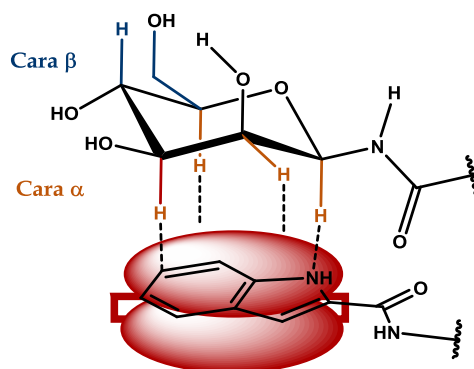


Figura 4.6 Representación de la selección de cara α hacia el indol y posibles interacciones CH- π

En cuanto al pirrol, el apantallamiento de sus resonancias es menos acusado pero significativo, especialmente para Py-5^B (Tabla 4.10). Al igual que sucedía en el caso de la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2**, los pirroles quedarían enfrentados en paralelo, por lo tanto sus protones apuntarían hacia la zona exterior del cono de apantallamiento del otro pirrol. Por este motivo, la variación de sus desplazamientos químicos es menor que la sufrida por los protones del carbohidrato que apuntan directamente al cono de apantallamiento del indol. Por último, en ambos derivados (**3** y **4**) el protón NH5 de la amida experimentó la mayor modificación en cuanto a su desplazamiento químico, se apantalló 0.71 ppm y 0.68 ppm respectivamente. A partir de los desplazamientos químicos inducidos de los derivados de D y L-manosa, se puede confirmar la existencia de una conformación mayoritaria en disolución acuosa en forma de horquilla, en donde la cara α del carbohidrato se orienta hacia el indol.

Tabla 4.10 Diferencia de desplazamientos químicos del pirrol B entre el modelo de carbohidrato 6 y las glico-oligoamidas catiónicas (**3**) y (**4**) ($\Delta\delta = \delta_{\beta\text{-D-Man-Py-}\gamma\text{[(R)NH}_3^+]\text{-Py-Ind}} - \delta_{\beta\text{-D-Man-Py-}\gamma\text{[(R)NH}_3^+]\text{-Py-Ind}}$)

		$\Delta\delta$ (ppm)	
		$\beta\text{-D-Man-Py-}\gamma\text{[(R)NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ 3	$\beta\text{-L-Man-Py-}\gamma\text{[(R)NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ 4
PIRROL	Py-5 ^B	0.32	0.44
	Py-3 ^B	0.25	0.14
	Me ^B	0.10	0.12
NH	NH5	0.71	0.68
	NH4	-0.07	-0.08

En este punto, en base a los desplazamientos químicos inducidos, se puede realizar una comparación entre estas dos glico-oligoamidas catiónicas derivadas de D y L-manosa (**3** y **4**), que tienen el OH2 en posición axial, y la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2** con el OH2 en posición ecuatorial. En primer lugar, cabe destacar la gran diferencia de valores de los desplazamientos químicos inducidos encontrada al

comparar ambos tipos de glico-oligoamidas (Figura 4.7). Mientras que en el caso de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**), los valores de los desplazamientos químicos inducidos ($\Delta\delta$) hallados no superan en ningún caso las 0.4 ppm, para β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) y β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**) se encuentran varios valores de $\Delta\delta$ por encima de 1 ppm. La interpretación que se puede hacer al respecto, es que en el caso de las glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4** con el OH2 en axial, existe una mejor definición de la conformación plegada en forma de horquilla, ya que los protones del carbohidrato se ven más afectados en este caso.

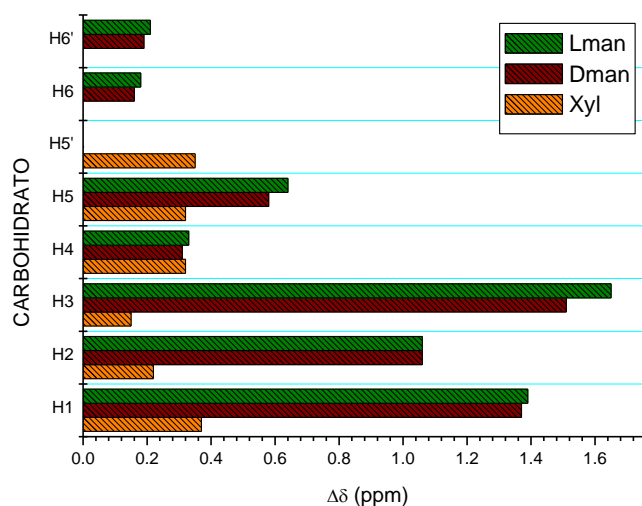


Figura 4.7 Gráfica comparativa de las diferencias de desplazamientos químicos inducidos ($\Delta\delta$) de β -D-Xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) (naranja), β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) (rojo) y β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**) (verde)

La segunda apreciación es que, mientras en el caso de la glico-oligoamida derivada de xilosa **2** existe una cierta homogeneidad en cuando a las variaciones de los desplazamientos químicos inducidos en la región del carbohidrato, encontrándose valores en torno a 0.3 ppm, para las glico-oligoamidas de D y L-manosa **3** y **4**, hay una clara distinción entre los valores encontrados para los protones de la cara α y los encontrados para protones de la cara β . Estos resultados confirman nuestra hipótesis de que en el caso de la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2**, existe una mezcla conformacional en disolución acuosa. Sin embargo, para las dos glico-oligoamidas catiónicas de D y L-manosa **3** y **4**, con el OH2 en posición axial, habría una conformación mayoritaria mejor definida que enfrenta al indol con la cara α del carbohidrato. El número de posibles interacciones CH- π con CH en posición axial es el mismo para ambas caras α de xilosa y manosa. No obstante, en el caso de la manosa hay una interacción extra favorable gracias al H2 en posición ecuatorial de la cara α , que además parece estar muy involucrado en la interacción con el indol, como muestra su desplazamiento químico inducido. En la cara β , además de encontrarse el OH2 en posición axial, solo podría establecerse una interacción CH- π y un enlace tipo n/π , entre el oxígeno del anillo de piranosa y el indol. En cambio, en la cara α de xilosa, el OH2 se encuentra en posición ecuatorial, y existen estudios recientes que demuestran que los hidroxilos en posición ecuatorial influyen de manera desfavorable en la

formación de complejos de este tipo.³ Además, en la cara β de xilosa hay dos CH en posición axial y uno en ecuatorial que podrían establecer interacciones CH- π favorables con el indol. Esta aproximación por la cara β también implicaría la participación del anillo de oxígeno de la piranosa en un enlace n/π con el anillo aromático. Atendiendo exclusivamente a las interacciones CH- π , este compendio de interacciones favorables y desfavorables en ambas caras de xilosa explicaría la mezcla conformacional observada en disolución acuosa, que contrasta con la situación claramente más favorable de la cara α en el caso de D y L-manosa.

4.2.2.2 Estudios de temperatura variable H_2O : acetona- d_6 (90:10)

En adición al estudio conformacional de las glico-oligoamidas catiónicas, se realizó un estudio de temperatura variable, para monitorizar el efecto de la temperatura en los desplazamientos químicos de 1H -RMN.

Se registraron espectros de 1H -RMN de las glico-oligoamidas **3** y **4** en H_2O /acetona- d_6 (90:10) cubriendo un rango de temperatura entre $-15\text{ }^\circ\text{C}$ y $0\text{ }^\circ\text{C}$. En el caso de β -D-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (**3**) solo se pudo bajar a $-10\text{ }^\circ\text{C}$ debido a la congelación de la muestra a $-15\text{ }^\circ\text{C}$. No se trabajó a temperaturas superiores a $0\text{ }^\circ\text{C}$ debido a la imposibilidad de detectar las resonancias de los protones hidroxilo. También se realizó el mismo experimento con el modelo hebra carbohidrato de D-manosa **6** (β -D-Man-Py-NHAc), con objeto de comparar el comportamiento del modelo y las glico-oligoamidas catiónicas bajo el efecto de la variación de temperatura.

En primer lugar cabe destacar que mientras en los espectros de 1H -RMN de β -D-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (**3**) y β -L-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (**4**) se aprecia movimiento de señales en función de la temperatura (Figura 4.8, se muestra el experimento con **4** a modo de ejemplo), en el caso de β -D-Man-Py-NHAc (**6**) no se observa tal desplazamiento (Figura 4.9). Esta diferencia de comportamiento sugiere la existencia de un equilibrio conformacional sensible a la temperatura que no tiene lugar en el modelo, al igual que sucedía en el caso de la glico-oligoamida catiónica de xilosa.

³ Andrés G. Santana, Ester Jiménez-Moreno, Ana M. Gómez, Francisco Corzana, Carlos González, Gonzalo Jiménez-Oses, Jesús Jiménez-Barbero, and Juan Luis Asensio *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 3347–3350.

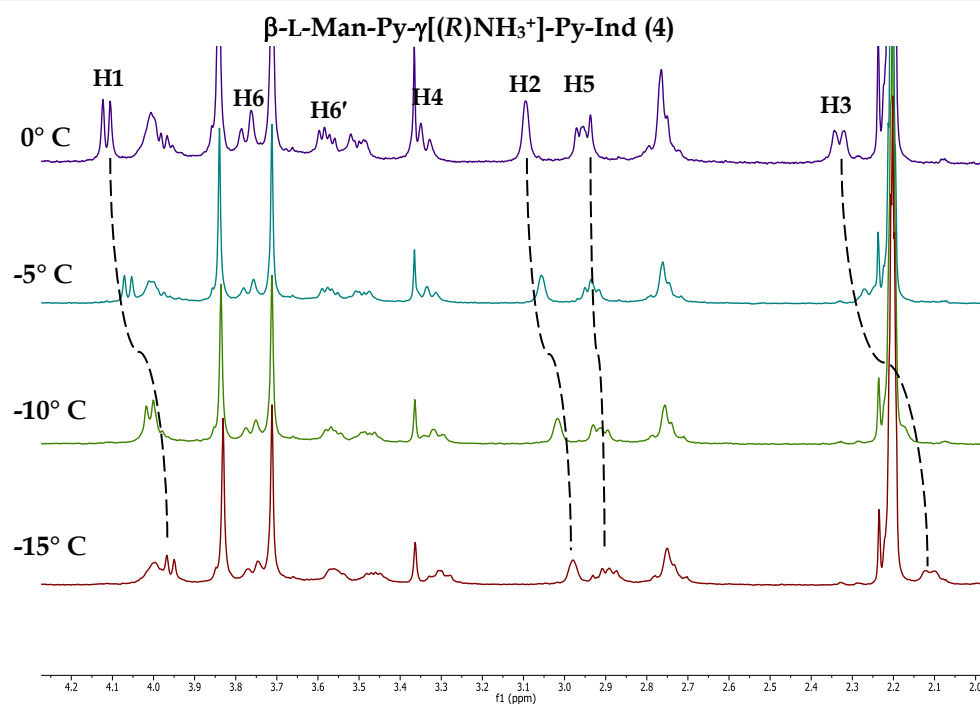


Figura 4.8 Ampliación de la zona del carbohidrato de los espectros de ¹H-RMN de β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind en H₂O/acetona-*d*₆ en el rango de 0 °C a -15 °C

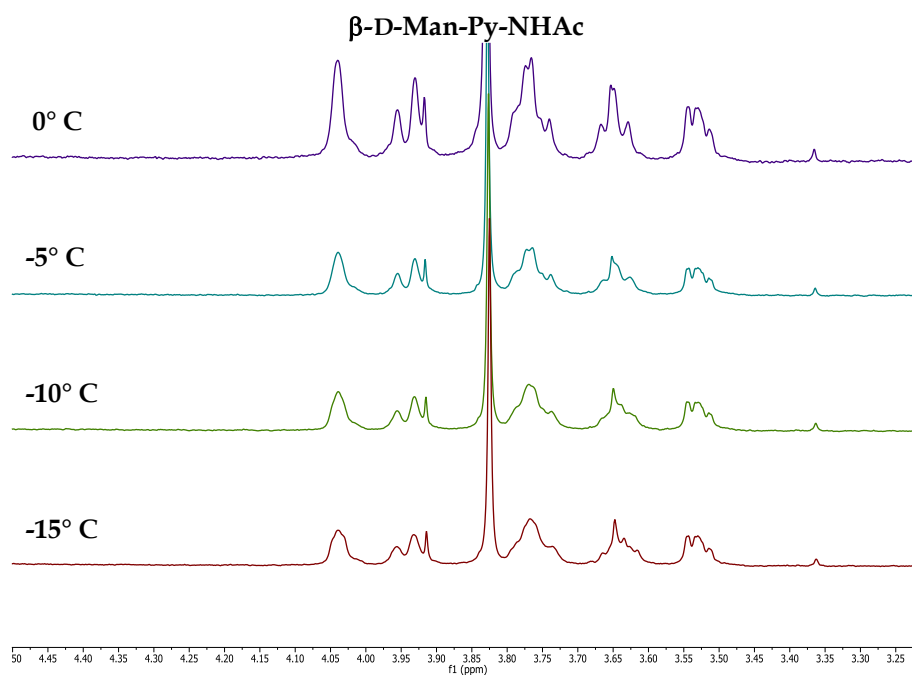


Figura 4.9 Ampliación de la zona del carbohidrato de los espectros de ¹H-RMN de β -D-Man-Py-NHAc en H₂O:acetona-*d*₆ en el rango de 0 °C a -15 °C

En segundo lugar, en los espectros de ambas glico-oligoamidas catiónicas se observan variaciones de desplazamientos químicos más o menos pronunciadas a medida que varía la temperatura, dependiendo de la señal observada. En la región aromática, las señales del indol no sufren variación de desplazamiento químico, en

cambio, algunas señales correspondientes a los pirroles si se ven afectadas (anexo capítulo 5). En cuanto a los protones del carbohidrato, sus resonancias no se ven afectadas de la misma forma. Las variaciones de desplazamientos más significativas para ambas glico-oligoamidas catiónicas correspondieron a las resonancias de los protones del carbohidrato H1, H2 y H3 (Tabla 4.11), todos ellos situados en la cara α del carbohidrato. Estas señales se apantallan a medida que se baja la temperatura, lo que indica una mayor definición de la horquilla. Sin embargo, los protones de la cara β no vieron afectados sus desplazamientos químicos con la temperatura. Este hecho apoya de nuevo la existencia de una preferencia de la cara α del carbohidrato hacia el indol.

Tabla 4.11 Variación de los desplazamientos químicos de los protones del carbohidrato con la temperatura de las glico-oligoamida catiónica **3** y **4**. $\Delta\delta = \delta_{273K} - \delta_{258K}$

		$\Delta\delta$ (ppm)	
		β -D-Man-Py- γ [(R)NH ₃ ⁺]-Py-Ind 3	β -L-Man-Py- γ [(R)NH ₃ ⁺]-Py-Ind 4
CARBOHIDRATO	H1	0.15	0.16
	H2	0.12	0.12
	H3	0.20	0.22
	H4	0.04	0.03
	H5	0.06	0.07
	H6	0.01	0.02
	H6'	0.02	0.03

4.2.2.3 Caracterización de la conformación plegada de las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa (**3**) y L-manosa (**4**) mediante experimentos NOESY

El último paso en la determinación de la conformación de las glico-oligoamidas β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) y β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**), es lograr corroborar la cercanía espacial de ambas hebras de la molécula. La confirmación de la existencia de la conformación plegada en forma de horquilla vendría determinada por la aparición en los espectros NOESY de nOes inter-hebra encontrados entre ambas unidades de pirrol y entre el carbohidrato y el indol.

Para ello se realizaron espectros NOESY y ROESY en D₂O a 25 °C, NOESY en H₂O/D₂O (90:10) a 5 °C y NOESY en H₂O/acetona-*d*₆ (90:10) a -15 °C. Con los espectros en H₂O fue posible detectar y obtener información de los protones intercambiables. No obstante, en los experimentos NOESY en H₂O/D₂O (90:10) a 5 °C, solo fue posible la detección de los NH, mientras que en H₂O/acetona-*d*₆ (90:10) a -15 °C se lograron detectar también los OH. En el anexo del capítulo se pueden encontrar

los espectros obtenidos en las diferentes condiciones empleadas. A continuación, se muestran los nOes más representativos que ayudaron a definir la conformación de las glico-oligoamidas catiónica **3** y **4** (Figura 4.10).

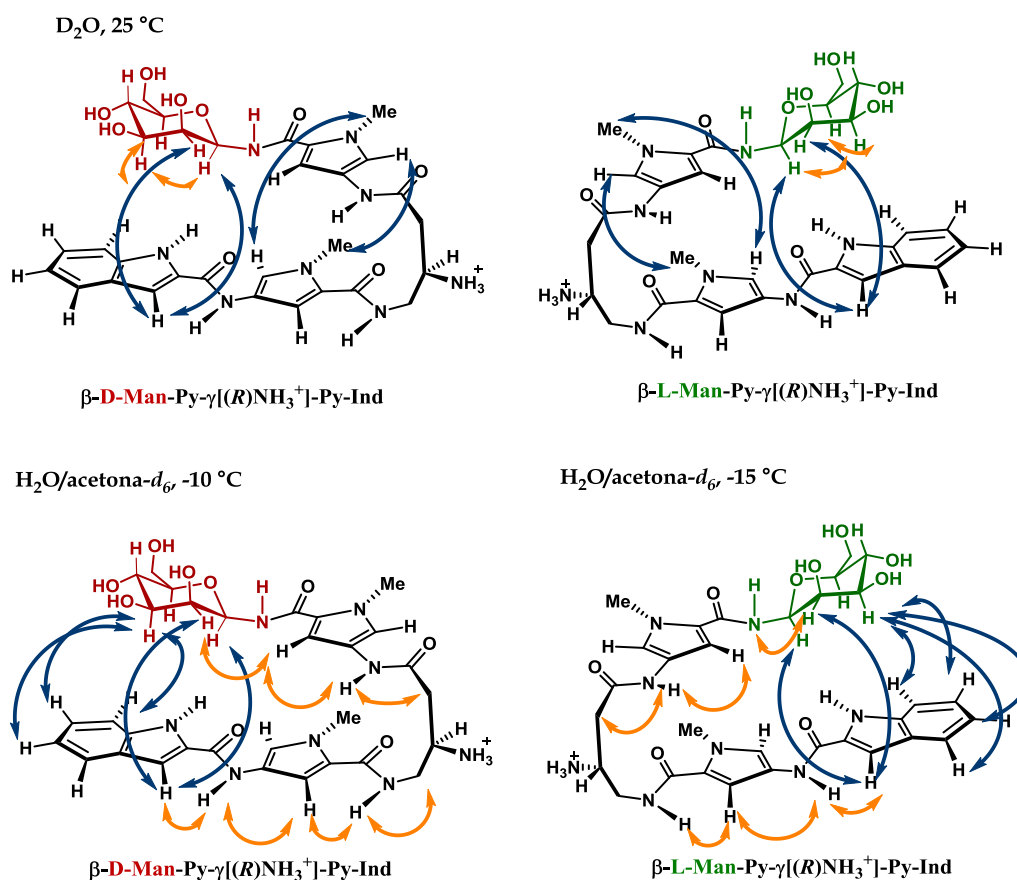


Figura 4.10 Representación esquemática de los nOes más significativos encontrados en los espectros ROESY en D_2O a 25 °C (parte superior) y NOESY en $H_2O/acetona-d_6$ (90:10) a -10 y -15 °C (parte inferior). En azul los nOes inter-hebra y en naranja los nOes intra-hebra. En los experimentos a baja temperatura solamente se muestran los nOes inter-hebra carbohidrato/indol.

En primer lugar, en todas las condiciones probadas y en ambas glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4**, se encontraron nOes claros inter-hebra entre las unidades de pirrol de tipo Py-5^A/Me^B y Py-5^B/Me^A. La observación de estos nOes es una prueba inequívoca de la presencia de un porcentaje importante de conformación plegada en forma de horquilla. Además, en esta ocasión también se encontraron nOes determinantes carbohidrato-indol, que se acentúan en los experimentos NOESY a baja temperatura. Los nOes observados carbohidrato-indol en ambos derivados de manosa se pueden ver en la Figura 4.11.

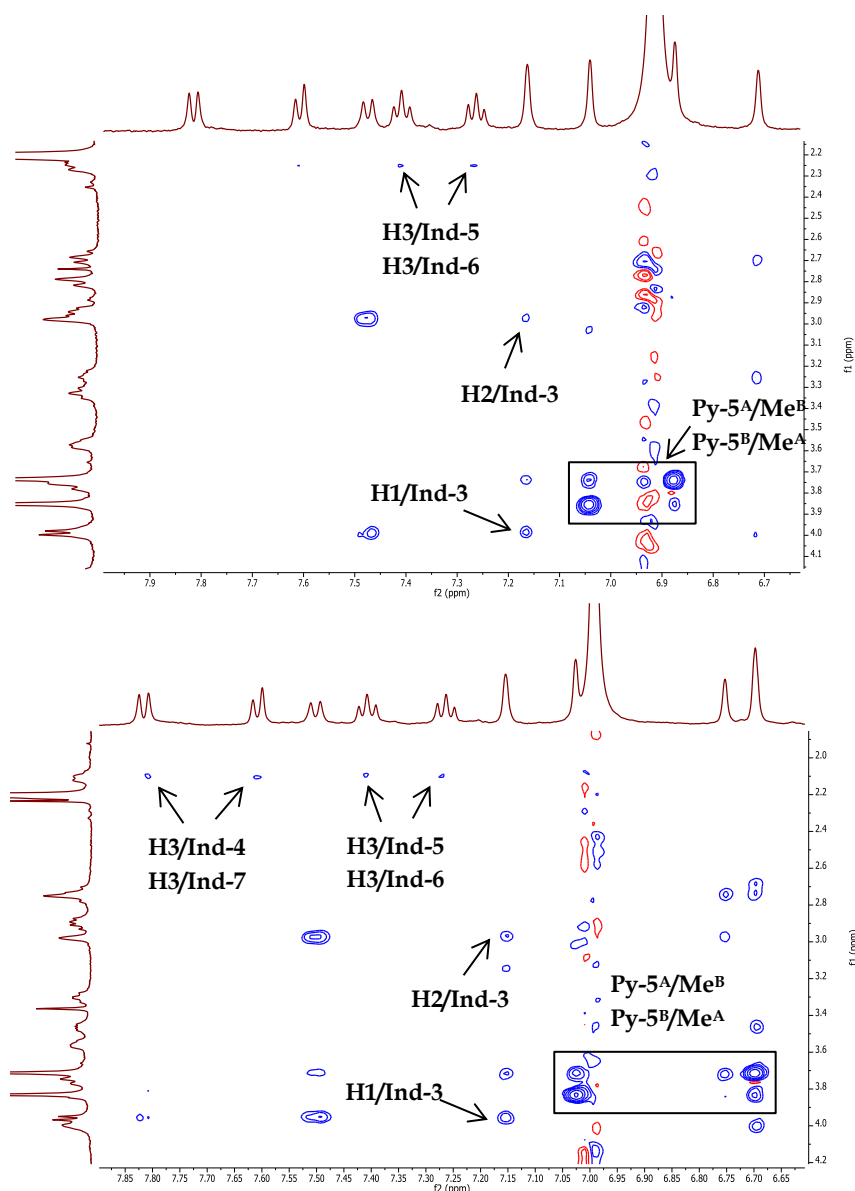


Figura 4.11 Ampliación del espectro NOESY de β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind 3 (arriba) y β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind 4 (abajo) en H₂O/acetona-*d*₆ (90:10) a -10 y -15 °C

Los nOes carbohidrato indol detectados en ambas glico-oligoamidas catiónicas, corresponden todos a protones que se hallan en la cara α del carbohidrato, indicando por tanto, la cercanía de esta cara al indol. La existencia de estos nOes corrobora los resultados obtenidos de los desplazamientos químicos inducidos, que apuntaban hacia una selección de la cara α del carbohidrato hacia el indol. De esta forma se define una orientación concreta del carbohidrato en la horquilla.

En cuanto a la conformación adoptada por el propio carbohidrato, la existencia de nOes entre H-1/H-3, H-1/H-5 y H-3/H-5 en ambas glico-oligoamidas catiónicas indica que la conformación del anillo de piranosa para β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) es de tipo ⁴C₁ y para β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) es ¹C₄.

En los experimentos en H₂O/acetona-*d*₆, ha sido posible detectar nOes de los protones intercambiables que han dado información valiosa sobre la forma arqueada

adoptada por las glico-oligoamidas. Se han obtenido nOes intra-hebra característicos (Figura 4.10), que al igual que en el caso del derivado de xilosa **2**, han permitido definir dos arcos diferentes: un arco interior delimitado por los grupos NH presentes en la estructura y otro arco exterior, delimitado por los grupos Me de los pirroles. No obstante, al comparar los datos conformacionales obtenidos para las dos glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4** (con el OH2 en axial), con los resultados obtenidos para la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2** (con el OH2 en ecuatorial), se pone de manifiesto la diferencia entre ambos tipos de glico-oligoamidas catiónicas. En el caso del derivado catiónico de D-xilosa, con el OH2 del carbohidrato en ecuatorial, los resultados apuntan a la existencia de una mezcla conformacional en disolución acuosa. Por el contrario, los datos de los derivados de D-manosa y L-manosa, con el OH2 del carbohidrato en axial, definen claramente una conformación mayoritaria en disolución acuosa, donde la cara α del carbohidrato se orienta hacia el indol.

Para completar la caracterización de la conformación plegada en forma de horquilla de las glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4** es importante definir la conformación del enlace amido-glicosídico. Como se ha mencionado en el capítulo anterior los parámetros de RMN que se emplean para el análisis de dicha conformación son las constantes de acoplamiento y la existencia de nOes. En el caso de los derivados de D y L-manosa, la observación del nOe NH5/Py-3^B ha permitido concluir que la configuración del enlace amida es Z.

Para obtener información acerca del ángulo de torsión entre los protones H1 y NH5 se ha medido el valor de la constante de acoplamiento NH5/H1 en los dos compuestos. Se han encontrado valores de 8.4 Hz para el derivado de D-manosa y 8.9 Hz para el de L-manosa. Estos valores son compatibles con ángulos diedros próximos a 0° o 180°, es decir, acordes a una conformación *syn* o *anti*, respectivamente. La diferenciación entre ambas conformaciones alrededor del enlace amidoglicosídico se basa en la presencia de nOes NH5/H1 o NH5/H2. Para los dos derivados se detectaron nOes fuertes NH5/H2 correspondientes a una conformación *anti* predominante, que sitúa al H2 cercano al protón NH5 amídico. Por lo tanto, se ha podido definir la conformación Z-*anti* del enlace amido-glicosídico tanto para β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) como para β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**).

Teniendo en cuenta la flexibilidad de estas moléculas y la posible coexistencia de varios confórmeros en disolución acuosa, es destacable que, de acuerdo con los datos experimentales, se pueda definir una o varias conformaciones mayoritarias plegadas en forma de horquilla. Hasta ahora se sabe que una posible conformación mayoritaria en disolución es una conformación en horquilla, con dos arcos, interior y exterior, definidos y que el enlace amido-glicosídico es Z-*anti*. En principio con estos datos, el plegamiento de estas glico-oligoamidas catiónicas puede dar lugar dos conformaciones diferentes relacionadas por un plano de simetría (Figura 4.12).

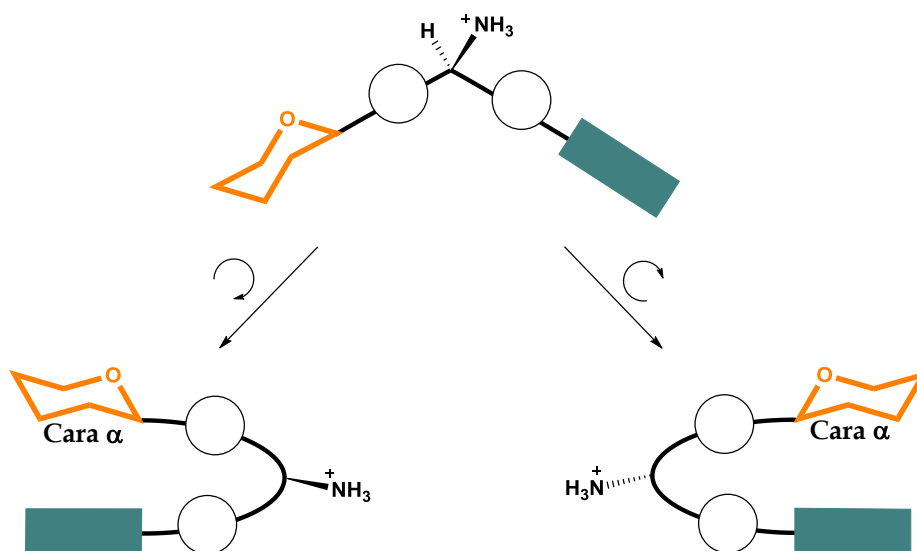


Figura 4.12 Esquema modelo de la ruta de plegamiento que origina las distintas estructuras en forma de horquilla de las glico-oligoamidas catiónicas. Los círculos representan los pirrolos y el rectángulo el indol, la estereoquímica del grupo amino del fragmento γ se indica para cada plegamiento.

Dervan, en los estudios de sus oligoamidas describe también dos tipos de plegamiento no superponibles para cada oligoamida relacionados entre sí por un plano de simetría. En su caso, cada tipo de plegamiento es responsable de una orientación determinada dentro del surco del ADN. Para sus oligoamidas aquirales, en ausencia de ADN, ambos plegamientos deberían ser energéticamente equivalentes. Sin embargo, para oligoamidas asimétricas con centros quirales en el fragmento γ puede haber diferencias energéticas para distintas orientaciones en el estado asociado, en función de cómo se oriente dentro del surco.⁴

En nuestro caso, si no hay datos experimentales que definan la orientación de una cara concreta del carbohidrato sobre el indol, se pueden encontrar cuatro tipos de plegamiento diferentes, ya que pueden existir dos tipos diferentes de plegamiento sobre cada una de las caras del carbohidrato. Afortunadamente, para el caso concreto de los derivados de *D* y *L*-manosa, gracias a los resultados experimentales se ha podido determinar que en la conformación mayoritaria hay una selección de la cara α del carbohidrato sobre el indol. De esta forma, el número de posibles plegamientos de la molécula se limita a dos. Se ha denominado plegamiento **A**, a la conformación en la cual quedan los centros C5, C6 y el oxígeno del anillo de piranosa del carbohidrato hacia el arco NH, del lado opuesto del NH del indol. Asimismo, se ha definido el plegamiento **B**, como la conformación en la cual los centros C2 y C3 del carbohidrato quedan hacia el arco NH, dejando a C5, C6 y el O del anillo de piranosa en el mismo lado que el NH del indol, orientados hacia el arco NMe.

A continuación, se muestran los dos plegamientos posibles para el caso de β -D-Man-Py- γ [(*R*)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) en la Figura 4.13.

⁴ Herman, D. M.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1382-1391

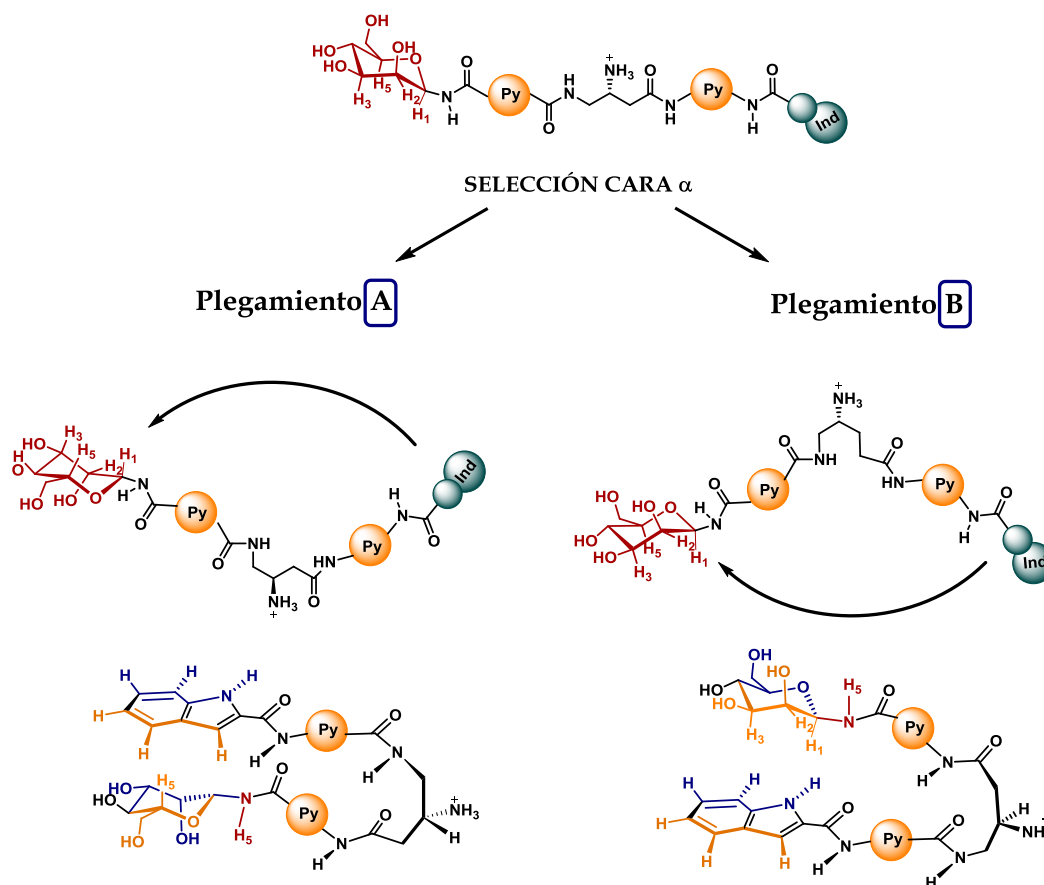


Figura 4.13 Esquema con los posibles plegamientos de β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind 3 sobre la cara α del carbohidrato. Los círculos naranjas representan los pirroles y los verdes al indol.

Partiendo de la molécula en su conformación extendida, caben dos posibilidades: la primera, que la hebra indol se aproxime por la parte superior de la hebra carbohidrato orientando la cara α hacia el indol (Figura 4.13, izquierda) dando lugar al denominado plegamiento **A**; la segunda posibilidad es que la hebra indol se aproxime por la parte inferior de la hebra carbohidrato, y este oriente la cara α hacia el indol dando lugar al plegamiento **B** (Figura 4.13, derecha). Como ya se ha comentado, la diferencia entre ambos plegamientos reside en que unos centros del carbohidrato quedarán hacia el arco NH y otros hacia el arco NMe. Así, en el caso de la molécula con D-manosa, en el plegamiento **A**, los centros C5, C6 y el oxígeno del anillo de piranosa del carbohidrato quedan hacia el arco NH. Sin embargo, en el plegamiento **B**, son los centros C2 y C3 los que quedan hacia el arco NH, dejando a C5, C6 y el O del anillo de piranosa en el mismo lado que el NH del indol, hacia el arco NMe. También se debe prestar atención a la orientación del grupo NH₃⁺ del fragmento γ en cada caso.

Del mismo modo, seleccionando la cara α para el caso de β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**), también existen las dos posibilidades (Figura 4.14).

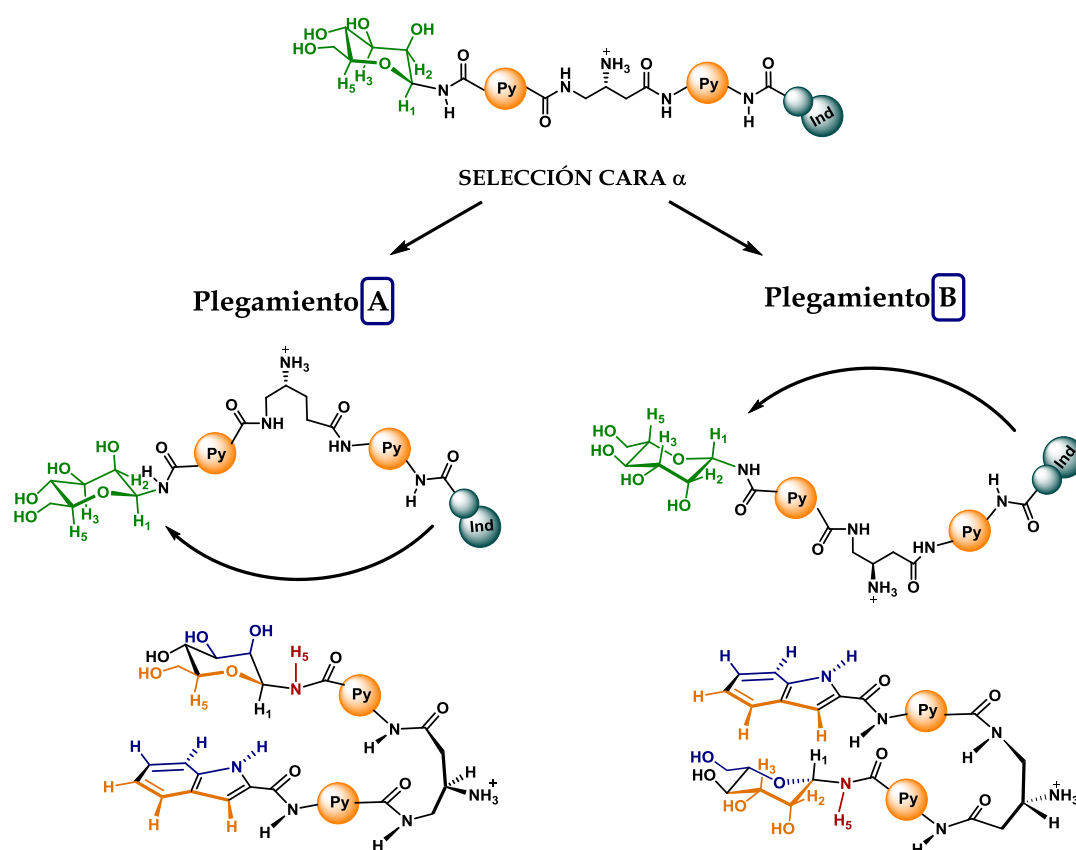
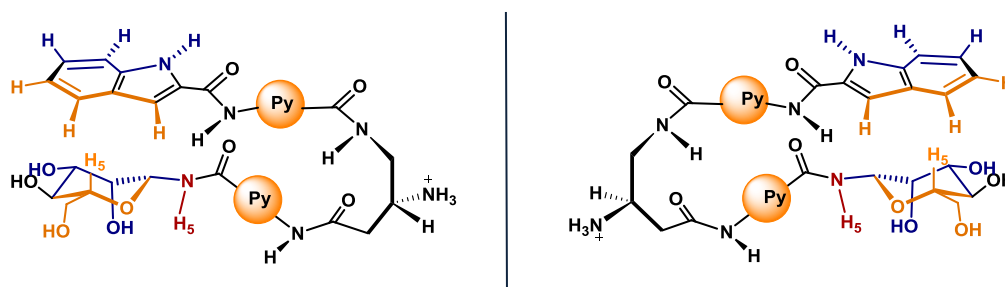


Figura 4.14 Esquema con los dos posibles plegamientos de β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind 4 sobre la cara α del carbohidrato. Los círculos naranjas representan a los pirroles y los verdes al indol.

En este caso, la aproximación del indol hacia el carbohidrato por la parte inferior genera el plegamiento de tipo **A**, en el que los centros C5, C6 y el oxígeno del anillo de piranosa del carbohidrato quedan hacia el arco NH. El plegamiento **B** se origina con la aproximación del indol por la parte superior de la hebra carbohidrato, quedando los centros C2 y C3 hacia el arco NH, dejando a C5, C6 y el O del anillo de piranosa en el mismo lado que el NH del indol, hacia el arco NMe.

Como se puede ver en la siguiente Figura 4.15, para un mismo tipo de plegamiento (**A** o **B**), los diastereómeros derivados de D y L-manosa orientan los centros del carbohidrato en idéntica disposición respecto al indol. Sin embargo, se obtienen estructuras tridimensionales opuestas, en función de si la glico-oligoamida catiónica contiene un carbohidrato de la serie D o uno de la serie L. En el caso particular del plegamiento **B** de ambos derivados, los centros del carbohidrato que quedan hacia el arco NH de la glico-oligoamida catiónica serían C2 y C3, precisamente donde se localiza el posible centro cooperativo del carbohidrato. No obstante, para el derivado de D-manosa en dicho plegamiento, el grupo amino en posición 3 del fragmento γ queda orientado hacia el mismo arco NH, mientras que en el derivado de L-manosa, ese residuo se orienta hacia el arco NMe. La diferente disposición de este residuo en ambas glico-oligoamidas catiónicas puede implicar variaciones en la interacción de estas con el surco menor del ADN.

Plegamiento A



Plegamiento B

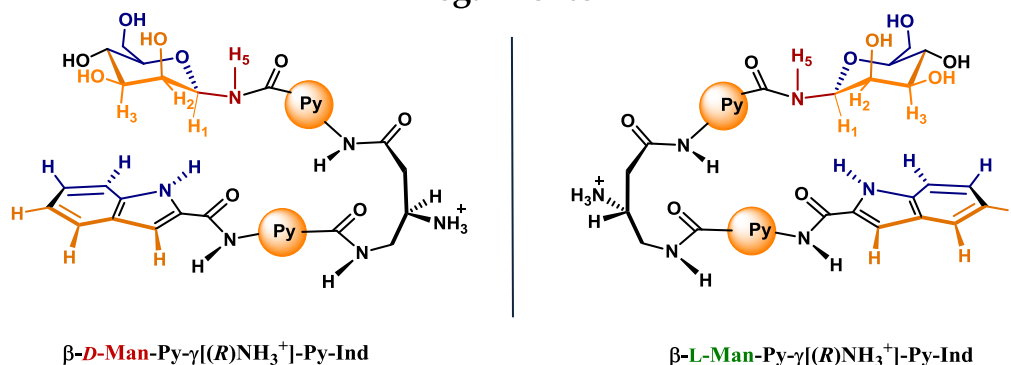


Figura 4.15 Esquema de los dos tipos de plegamiento A y B para ambas glico-oligoamidas 3 y 4

La relevancia del estudio detallado de la conformación en el estado libre y el tipo de plegamiento en cada caso, es poder explicar posteriormente, la posible proximidad de los centros cooperativos de enlace de hidrógeno del carbohidrato, a los aceptores presentes en el surco menor del ADN.

La manera de determinar el tipo de plegamiento a nivel experimental es, de nuevo, interpretando los nOes carbohidrato indol encontrados. Los espectros NOESY en H₂O/acetona-*d*₆ (90:10) a -15 °C de las dos glico-oligoamidas catiónicas 3 y 4 han mostrado nOes H1/Ind-3 y H2/Ind-3, indicando la cercanía de los centros C1 y C2 del carbohidrato con Ind-3 del indol. Esto puede sugerir la presencia de un porcentaje mayoritario de un plegamiento de tipo B en disolución en ambos derivados. Los nOes del H3 del carbohidrato con los protones del anillo de seis miembros del indol, podrían situar a H3 cercano al centro del anillo, mientras que la ausencia de nOes H5 indol lo sitúan más alejado. Retomando los resultados de los desplazamientos químicos inducidos de los derivados de D y L-manosa, donde el máximo desplazamiento químico inducido de los protones de la cara α , era el de H3 (1.51 y 1.65 ppm, respectivamente) seguido por H1 y por H2 y el menor era H5 (0.58 y 0.64 ppm, respectivamente), se observa que hay una gran concordancia entre estos y los resultados de los nOes.

4.2.2.4 Conclusiones del estudio conformacional en agua de las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa **3** y L-manosa **4**

Todos los datos obtenidos de los estudios conformacionales de RMN en agua, apuntan a la presencia en disolución de un porcentaje importante de una conformación plegada en forma de horquilla bien definida para ambas glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa (**3**) y L-manosa (**4**). Los desplazamientos químicos inducidos y los experimentos de temperatura variable apuntaban hacia una posible disposición preferente del carbohidrato donde la cara α se orientaría hacia el indol. Gracias a la obtención de nOes claros entre la cara α del carbohidrato y el indol, se confirmó la orientación preferente del carbohidrato tanto para β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) como para β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**). Además estos nOes permitieron definir el tipo de plegamiento presente en ambas glico-oligoamidas catiónicas, siendo de tipo **B** para las dos. No obstante, como cada una de las glico-oligoamidas **3** y **4** contiene un enantiómero diferente, D-manosa y L-manosa respectivamente, la obtención de los mismos resultados experimentales en ambos casos origina dos estructuras tridimensionales opuestas (Figura 4.16 y Figura 4.17). En ambas moléculas el carbohidrato se orienta de la misma forma (cara α) y se obtiene el mismo plegamiento **B**, por lo que la orientación de los centros C2 y C3 es la misma en ambos, hacia el arco interno NH. Sin embargo, el grupo amino del fragmento γ se orienta de manera distinta en cada molécula.

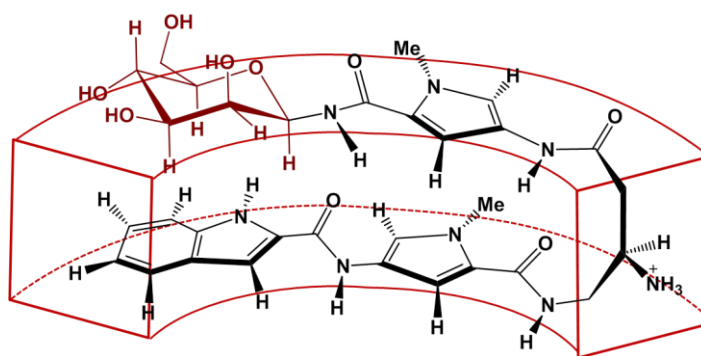


Figura 4.16 Representación de la conformación adoptada en agua por β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**)

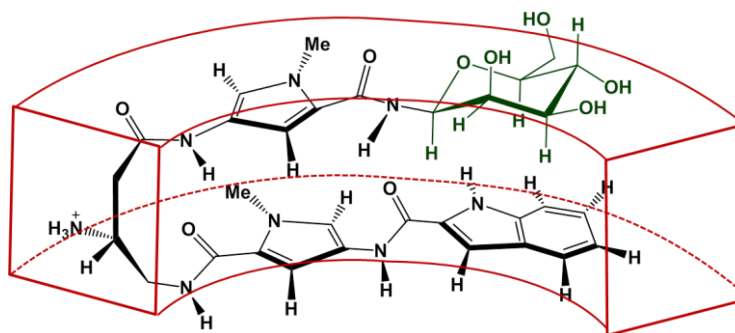


Figura 4.17 Representación de la conformación adoptada en agua por β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**)

Por lo tanto, para nuestras glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4**, la obtención de estas conformaciones opuestas, puede tener implicaciones importantes en su unión con el ADN. No solo hay que prestar atención a la orientación de los centros cooperativos de enlace de hidrógeno del carbohidrato, sino también a la colocación del grupo amino del fragmento γ en cada caso, que puede favorecer o desfavorecer una orientación determinada dentro del surco menor del ADN.

4.2.3 Caracterización de los enlaces de hidrógeno intramoleculares de las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa **3** y L-manosa **4** por RMN

Una vez caracterizada la conformación en forma de horquilla adoptada en disolución acuosa por las glico-oligoamidas catiónicas de D y L-manosa y habiendo demostrado la implicación de las interacciones CH- π en la estabilización de dicha conformación, otro punto importante era poder demostrar la existencia del enlace de hidrógeno NH5 \cdots OH2 intramolecular en agua, que haga que OH2 sea un dador cooperativo de enlace de hidrógeno.

En general la caracterización en agua de los enlaces de hidrógeno no es trivial. En el caso concreto del empleo de RMN para la caracterización, la dificultad añadida es la compleja detección de las señales de los protones intercambiables (NH, OH) involucrados en el enlace de hidrógeno. A pesar de esto, existen ejemplos en la literatura donde se han podido caracterizar redes de enlaces de hidrógeno intramoleculares con participación de hidroxilos de carbohidratos mediante la detección en agua de las señales de RMN de los hidroxilos a baja temperatura.⁵

Basándonos en estos precedentes, en nuestro laboratorio se ha puesto a punto un protocolo para caracterizar enlaces de hidrógeno en agua empleando RMN. Este protocolo consiste en la detección en agua de los protones intercambiables OH y NH a baja temperatura, y el estudio posterior de parámetros tales como, desplazamientos químicos de los protones involucrados, constantes de acoplamiento de dichos protones, coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$) y la existencia de nOes entre los protones participantes en el enlace.⁶

En primer lugar se detectaron y asignaron las señales de los protones intercambiables en los espectros ^1H -RMN en $\text{H}_2\text{O}/\text{acetona-}d_6$ (90:10) a -15°C (Figura 4.18). Como se ha comentado en el apartado de asignaciones (4.2.1.2), la caracterización de estos protones se ha realizado gracias a experimentos bidimensionales TOCSY y NOESY. En este estudio, además de las glico-oligoamidas de D y L-manosa (**3** y **4**), con el OH2 en axial con posibilidad de formar enlace de hidrógeno con NH5, también se estudió la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2** y el modelo hebra carbohidrato de β -

⁵ (a) Vilén, E. M.; Lundqvist, L. C. E.; Jouanneau, D.; Helbert, W.; Sandström, C. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3487-3494. (b) Hakkarainen, B.; Kenne, L.; Lahmann, M.; Oscarson, S.; Sandström, C. *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, 1076-1080. (c) Bekiroglu, S.; Kenne, L.; Sandström, C. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2465-2468 (d) Sandström, C.; Baumann, H.; Kenne, L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 809-815

⁶ M. T. Blázquez-Sánchez, F. Marcelo, M. C. Fernández-Alonso, A. Poveda, J. Jiménez-Barbero, C. Vicent, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 17640-17652.

D-Xil-Py-NHAc **5**, con el OH2 en ecuatorial y sin posibilidad de formar enlace de hidrógeno, con fines comparativos. Desafortunadamente, en el caso del derivado de xilosa **2**, no fue posible detectar las señales de los OH, aun así se logró información valiosa de las resonancias de los NH. Por lo tanto, la comparación con el modelo de xilosa **5**, fue fundamental puesto que si se lograron detectar los OH. Por último, para estudiar la influencia de la hebra indol sobre el carbohidrato, también se estudió al estudio el modelo hebra carbohidrato de β -D-Man-Py-NHAc **6**.

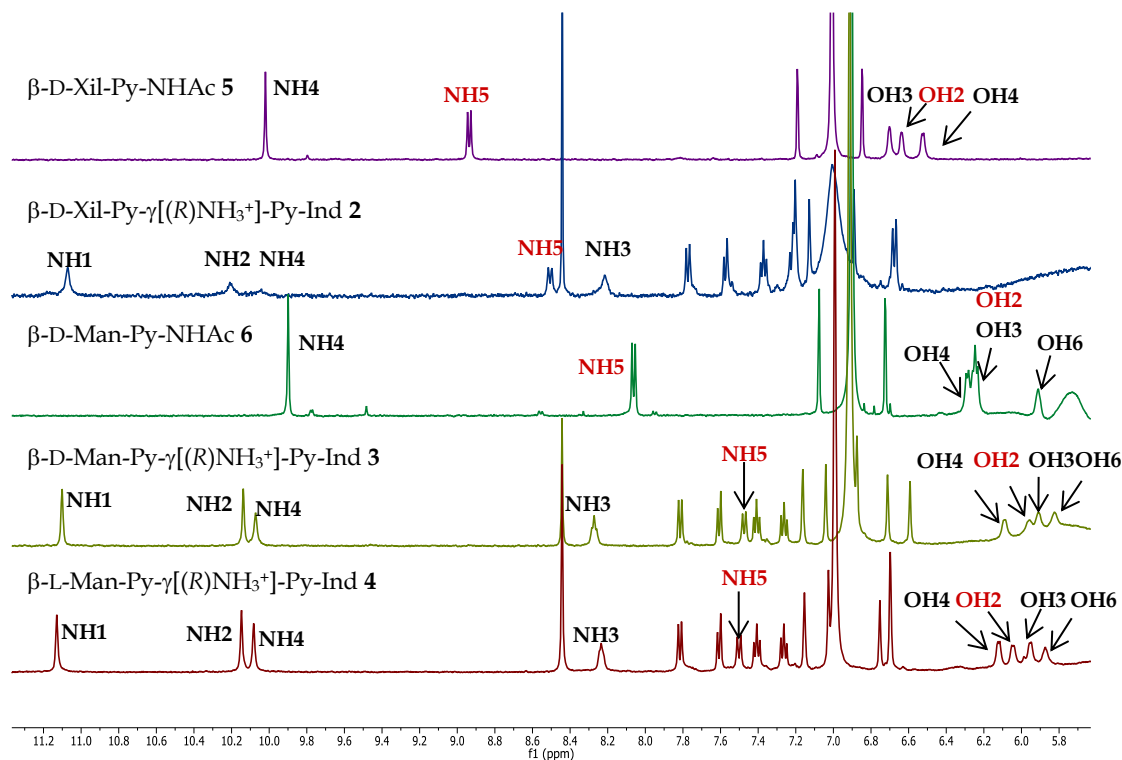


Figura 4.18 Espectros ^1H -RMN con los protones intercambiables asignados de β -D-Xil-PyNHAc (**5**) (morado), β -D-Xil-Py- γ [(R)NH $_3^+$]-Py-Ind **2** (azul), β -D-Man-PyNHAc (**6**) (verde), β -D-Man-Py- γ [(R)NH $_3^+$]-Py-Ind (**3**) (verde pistacho) y β -L-Man-Py- γ [(R)NH $_3^+$]-Py-Ind (**4**) (rojo) en H $_2$ O/acetona- d_6 a -15°C

La primera apreciación que se puede realizar viendo los desplazamientos químicos del NH5 en los distintos derivados, es que en el caso de las glico-oligoamidas catiónicas con el OH2 en axial, **3** y **4**, la señal del NH5 (7.47 y 7.5 ppm) se encuentra bastante más apantallada que en el caso de la glico-oligoamida catiónica **2** (8.51 ppm), con el OH2 en posición ecuatorial. En el caso del modelo de hebra carbohidrato de D-manosa **6**, el NH5 muestra un desplazamiento intermedio (8.12 ppm) entre ambos extremos de los dos tipos de glico-oligoamidas catiónicas. En cambio, en el modelo hebra carbohidrato de xilosa **5**, el NH5 se encuentra bastante desapantallado (8.93 ppm), comparado con el mismo protón en el resto de compuestos. Este comportamiento del NH5 contrasta con la similitud de desplazamientos químicos encontrada en el resto de los protones NH de la molécula. La tendencia seguida por los desplazamientos químicos de los NH5 en los distintos derivados sería la siguiente:

$$\delta_{\text{NH5(hebra carbohidrato-ec)}} > \delta_{\text{NH5(glico-ec)}} > \delta_{\text{NH5(hebra carbohidrato-ax)}} > \delta_{\text{NH5(glico-ax)}}$$

En cuanto a la comparación entre los modelos (**5** y **6**) y sus respectivas glico-oligoamidas catiónicas (**2-4**), se puede concluir que los desplazamientos químicos del NH5 se encuentran más apantallados en el caso de las glico-oligoamidas catiónicas respecto a sus correspondientes modelos. Si se realiza la comparación entre los derivados que tienen el OH2 del carbohidrato en posición axial (**3**, **4** y **6**) y los derivados con el OH2 en posición ecuatorial (**2** y **5**), se observa un mayor apantallamiento en el caso los primeros. *A priori*, esto podría sugerir que los NH5 de las glico-oligoamidas **3** y **4**, los más apantallados, se encontrarían participando en el enlace de hidrógeno intramolecular NH5 \cdots OH2.

En cuanto al desplazamiento de los OH, no se puede establecer la comparación de las glico-oligoamidas **3** y **4** con la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2**, debido a la imposibilidad de detectar las resonancias de los OH en esta última. No obstante, ha sido fundamental disponer del modelo β -D-Xil-Py-NHAc **5**, en la comparación con el modelo hebra carbohidrato derivado de D-manosa **6**. En general se observa que las señales de los OH en las glico-oligoamidas catiónicas se encuentran más apantalladas, especialmente OH2, OH3 y OH4. Sí fue posible detectar las resonancias de los OH en el modelo de xilosa **5**, y estos aparecen a campo más bajo que los hidroxilos del modelo de D-manosa **6** (Figura 4.18).

Después asignar y analizar los desplazamientos químicos de los protones involucrados en el enlace de hidrógeno, el siguiente paso es examinar el resto de parámetros de RMN que pueden aportar información sobre los núcleos participantes en el enlace de hidrógeno: las constantes de acoplamiento y los coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$). El resumen de estos datos se recoge en las siguientes tablas (Tabla 4.12 y Tabla 4.13).

Tabla 4.12 Constantes de acoplamiento (J), diferencia de desplazamiento químico ($\Delta\delta$) con la temperatura y coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$) medidos entre 0 °C y -15 °C de las resonancias de los protones intercambiables NH de las glico-oligoamidas 2-4 y los modelos 5 y 6 medidas en H₂O/acetona-d₆ a -15 °C

		NH1	NH2	NH3	NH4	NH5
β -D-Xil-Py-NHAc (5)	J (Hz) $\Delta\delta$ (ppm) $ \Delta\delta/\Delta T $ (ppb/°C)	-	-	-	s 0.1 6.7	d (8.8) 0.13 8.7
β -D-Xil-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (2)	J (Hz) $\Delta\delta$ (ppm) $ \Delta\delta/\Delta T $ (ppb/°C)	s 0.06 4.0	s 0.04 4.0 ^a	t (6.8) 0.08 5.3	s 0.04 4.0 ^a	d (8.4) 0.08 5.3
β -D-Man-Py-NHAc (6)	J (Hz) $\Delta\delta$ (ppm) $ \Delta\delta/\Delta T $ (ppb/°C)	-	-	-	s 0.11 7.3	d (8.6) 0.09 6.0
β -D-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind ^b (3)	J (Hz) $\Delta\delta$ (ppm) $ \Delta\delta/\Delta T $ (ppb/°C)	s 0.06 6.0	s 0.04 4.0	t (6.8) 0.06 6.0	s 0.05 5.0	d (8.4) 0.003 0.3
β -L-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (4)	J (Hz) $\Delta\delta$ (ppm) $ \Delta\delta/\Delta T $ (ppb/°C)	s 0.08 5.3	s 0.06 4.0	t (5.6) 0.06 4.0	s 0.07 4.7	d (8.6) 0.015 1.0

^a Al subir la temperatura se pierde la señal antes de cubrir todo el rango de temperaturas.

^b Para el caso de β -D-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind solo fue posible cubrir el rango de temperaturas desde 0 a -10 °C.

Tabla 4.13 Constantes de acoplamiento (J), diferencia de desplazamiento químico ($\Delta\delta$) con la temperatura y coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$) medidos entre 0 °C y -15 °C de las resonancias de los protones intercambiables OH de las glico-oligoamidas 2-4 y los modelos 5 y 6 medidas en H₂O/acetona-d₆ a -15 °C

		OH2	OH3	OH4	OH6
β -D-Xil-Py-NHAc (5)	J (Hz) $\Delta\delta$ (ppm) $ \Delta\delta/\Delta T $ (ppb/°C)	s.a. 0.15 10.0	s.a. 0.16 10.7	s.a. 0.15 10	-
β -D-Man-Py-NHAc (6)	J (Hz) $\Delta\delta$ (ppm) $ \Delta\delta/\Delta T $ (ppb/°C)	m 0.15 10.0	m 0.15 10.0	d (6.4) 0.16 10.7	s.a. 0.18 12.0
β -D-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind ^a (3)	J (Hz) $\Delta\delta$ (ppm) $ \Delta\delta/\Delta T $ (ppb/°C)	s.a. 0.06 6.0	s.a. 0.11 11.0	s.a. 0.11 11.0	s.a. 0.12 12.0
β -L-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (4)	J (Hz) $\Delta\delta$ (ppm) $ \Delta\delta/\Delta T $ (ppb/°C)	d (6.9) 0.10 6.7	d (6.1) 0.15 10.0	d (6.7) 0.14 9.3	s.a. 0.16 12.0

^a Para el caso de β -D-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind solo fue posible cubrir el rango de temperaturas desde 0 a -10 °C.

Respecto a las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{OH/CH}}$, es conocido que para grupos hidroxilo sin una orientación predominante, los valores dichas constantes se aproximan a los 5.5 ± 0.5 Hz. Valores más grandes o más pequeños indican una geometría preferida y un giro alrededor del ángulo diedro relativamente restringido. De acuerdo con la ecuación de Karplus,⁷ una constante de acoplamiento de aproximadamente 9 Hz indica una conformación predominante en la que el enlace OH esta en *anti* al enlace CH. Para que el protón hidroxilo esté bloqueado en una orientación alrededor del enlace C–O que da lugar a un valor extremo de constante de acoplamiento, parece lógico pensar que su movimiento esté restringido por estar involucrado en un EH. Desafortunadamente, la mayoría de las señales de los hidroxilos aparecen como singletes anchos y por lo tanto sus constantes de acoplamiento no pudieron ser medidas. Las constantes de acoplamiento que sí pudieron ser medidas de la glico-oligoamida de L-manosa (**4**) oscilan entre 6.0 y 6.9 Hz y no proporcionan información concluyente.

Si observamos las constantes de acoplamiento entre NH5 y H1, los valores obtenidos de $^3J_{\text{NH5/H1}}$ para las glico-oligoamidas catiónicas **2-4** y los modelos de hebra azúcar **5** y **6** son similares (entre 8.4 y 8.8 Hz) reflejando una conformación similar de todos los derivados alrededor del enlace amido-glicosídico. Estos valores de constantes de acoplamiento, junto con la detección del nOe NH5/H2, indican una orientación predominante tipo *anti* entre NH5 y H1, en todos los derivados de manosa.

Uno de los parámetros que proporcionó los indicios más concluyentes de la existencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares en las glico-oligoamidas **3** y **4** fue el coeficiente de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$) de los protones intercambiables. En primer lugar se realizó el análisis de los valores de coeficientes de temperatura de todos los NH de las glico-oligoamidas catiónicas. Se ha descrito en la bibliografía que valores de coeficientes de temperatura pequeños (-2.0 ± 1.4 ppb/°C) suelen asociarse con protones NH involucrados en enlaces de hidrógeno. Sin embargo, los NH expuestos al disolvente muestran valores mayores, entre -6.0 y -8.5 ppb/°C.⁸ En la Tabla 4.12 llama la atención que todos los valores de los coeficientes de temperatura de los protones amídicos de todos los derivados (**2-6**) están en un rango entre 4 y 8.7 ppb/°C, excepto en el caso de los NH5 de las glico-oligoamidas derivadas de D y L-manosa **3** y **4**, que son del orden de de 1.0 ppb/°C para β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**) y hasta un orden de magnitud inferior, 0.3 ppb/°C, en el caso β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**). Estos valores reflejan que el NH5 está menos expuesto para interaccionar con el disolvente que el resto de NH presentes en la molécula. Cabe destacar, la comparación de estos dos valores con el coeficiente de temperatura de ese mismo protón del derivado de xilosa **2**. Se observa que este último es un orden de magnitud mayor (5.3 ppb/°C). Por lo tanto, este dato apoya la teoría de la existencia de un enlace de hidrógeno intramolecular entre NH5 y OH2 en los derivados **3** y **4**.

⁷ Fraser, R. R.; Kaufman, M.; Morand, P.; Govil, G. *Can. J. Chem.* **1969**, 47, 403.

⁸ Andersen, N. H.; Neidigh, J. W.; Harris, S. M.; Lee, G. M.; Liu, Z.; Tong, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8547-8561.

En cuanto a los valores de coeficientes de temperatura encontrados para los grupos hidroxilo, se han logrado obtener para todas las moléculas, excepto para la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2**. Por ello, para realizar el estudio, se comparará con el modelo β -D-Xil-Py-NHAc **5**. La Tabla 4.13 muestra que todo los valores de los coeficientes de temperatura, para todos los derivados (**3-6**) son del orden de 10 ppb/°C o superiores. De manera significativa, los coeficientes de temperatura del OH2 en los derivados de D y L-manosa **3** y **4**, tienen unos valores de 6.0 y 6.7 ppb/°C, respectivamente, lo cual contrasta con el resto de valores.

En conjunto, los coeficientes de temperatura medidos para los protones intercambiables de las distintas glico-oligoamidas catiónicas (**2-4**) corroboran la existencia de un enlace de hidrógeno intramolecular $\text{NH5} \cdots \text{OH2}$ en las glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4** (Figura 4.19). Especialmente significativo es el bajo coeficiente de temperatura del NH5 en ambos derivados **3** (0.3 ppb/°C) y **4** (1.0 ppb/°C), con el OH2 del carbohidrato en axial, frente al coeficiente encontrado para el NH5 del derivado de xilosa **2** (5.3 ppb/°C), con el OH2 en posición ecuatorial.

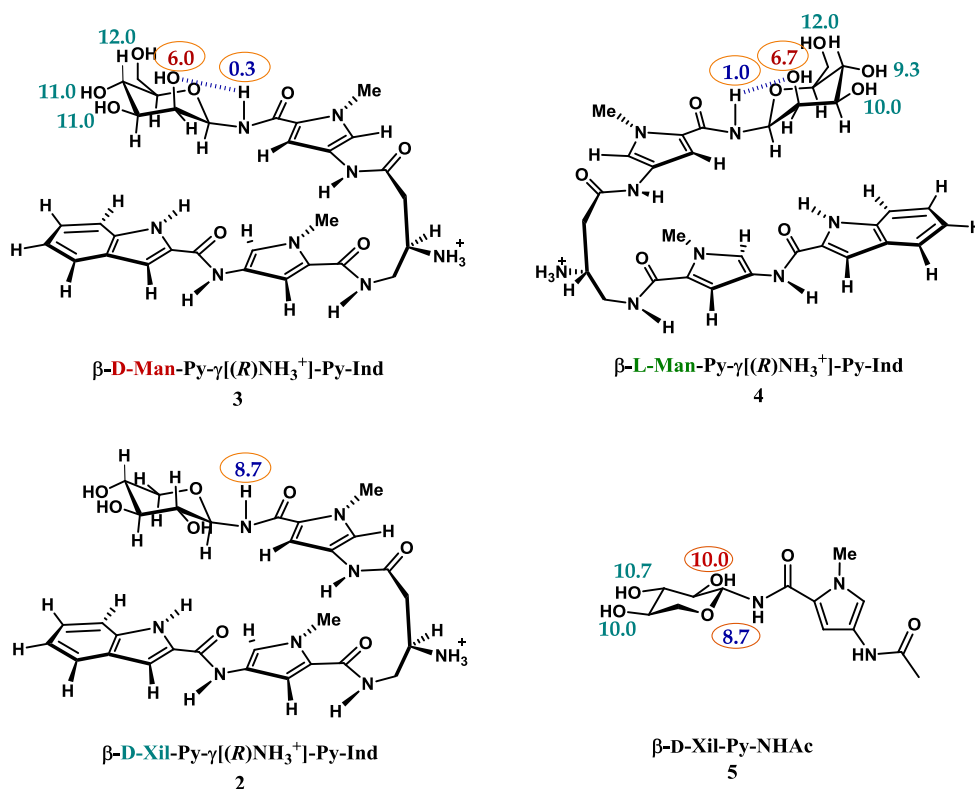


Figura 4.19 Coeficientes de temperatura de las glico-oligoamidas catiónicas **2-4** y el modelo carbohidrato β -D-Xil-Py-NHAc **5**

Los experimentos NOESY de β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**) mostraron evidencias adicionales de la existencia del enlace de hidrógeno. Se logró detectar un nOe entre el OH2 y el NH5 confirmando la cercanía espacial entre ambos protones.

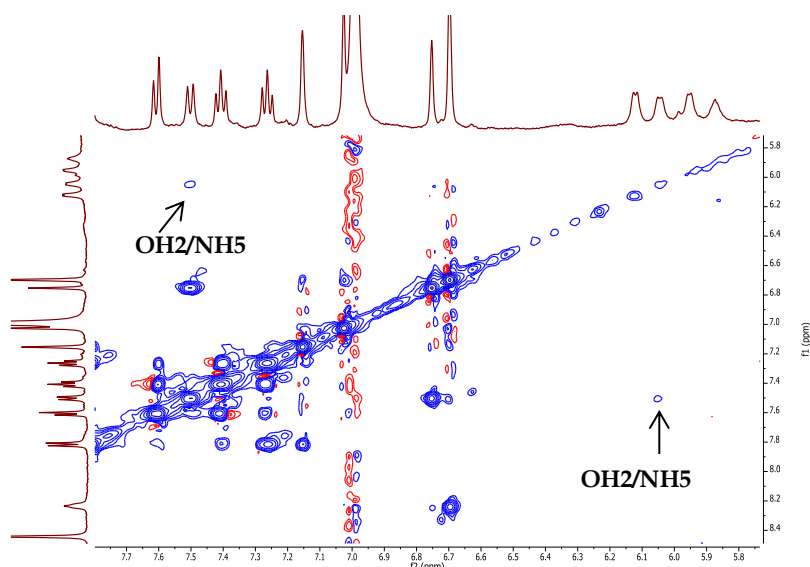


Figura 4.20 Ampliación del espectro NOESY de β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**) en H₂O/acetona-*d*₆ a -15 °C

Todos los datos en su conjunto permiten confirmar que el cambio de la configuración del C2 del carbohidrato, de ecuatorial en el derivado de xilosa **2**, a axial en los derivados de manosa **3** y **4**, permite la formación de la red de enlace de hidrógeno intramolecular NH5...OH2 en β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) y en β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**). De esta forma se genera un anillo de 5 miembros que involucra al NH5 de la amida anomérica en posición β y al OH2 en posición axial, pudiendo actuar además OH2 como un centro donador de enlace de hidrógeno cooperativo en procesos intermoleculares.

Para examinar la influencia de la región aromática de la hebra indol de las glico-oligoamida catiónicas sobre el carbohidrato y sobre la conformación global de nuestros ligandos, también se calcularon y analizaron los coeficientes de temperatura de los modelos hebra carbohidrato β -D-Xyl-Py-NHAc (**5**) y β -D-Man-Py-NHAc (**6**) (Tabla 4.12 y Tabla 4.13). En principio, cabría esperar que se obtuvieran valores bajos en los coeficientes de temperatura del NH5 y OH2 del modelo de D-manosa **6**, apuntando a la existencia del enlace de hidrógeno y valores altos en el caso del modelo de xilosa **5**. Sorprendentemente, los valores encontrados indican que el enlace de hidrógeno intramolecular NH5...OH2 no persiste en agua en el modelo de D-manosa **6**. Se encontraron coeficientes de temperatura similares en ambos modelos tanto en los NH como en los OH (Figura 4.21). Los coeficientes de todos los OH oscilan en torno a 10 ppb/°C, no habiendo diferencias entre ellos dentro de la misma molécula y los valores de los NH5 son elevados.

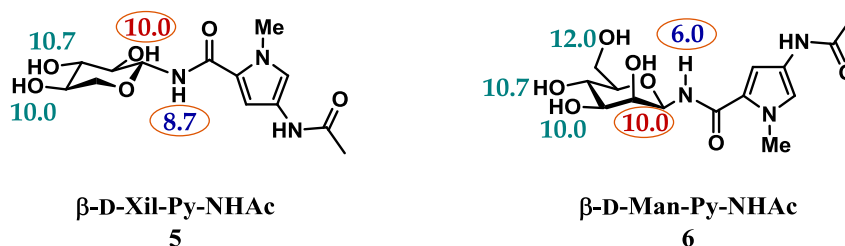


Figura 4.21 Coeficientes de temperatura de las resonancias de los protones intercambiables de los modelos hebra carbohidrato β -D-Xyl-Py-NHAc (5) y β -D-Man-Py-NHAc (6)

Si se comparan estos valores con los coeficientes de temperatura obtenidos para las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa y L-manosa se observa una gran diferencia especialmente en el caso del NH5. En el modelo hebra carbohidrato de D-manosa (6) se obtiene un coeficiente de temperatura para el NH5 de 6.0 ppb/°C mientras que en las glico-oligoamidas 3 y 4 se obtienen valores de 0.3 ppb/°C y 1.0 ppb/°C respectivamente. En cuanto al OH2, el coeficiente en el modelo de D-manosa (6) es de 10.0 ppb/°C, contrastando con los valores calculados para las glico-oligoamidas 3 y 4, 6.0 ppb/°C y 6.7 ppb/°C.

Estas diferencias halladas en los datos experimentales sugieren la existencia de un enlace de hidrógeno intramolecular en las glico-oligoamidas catiónicas β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) y β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4), que no se da en el modelo hebra carbohidrato β -D-Man-Py-NHAc (6). Este hecho hace concluir que la hebra indol influye de alguna manera en la formación del enlace de hidrógeno.

Una de las hipótesis planteadas es que haya una estabilización del enlace de hidrógeno intramolecular gracias al establecimiento de interacciones CH- π con la hebra indol, existiendo cooperatividad entre ambas interacciones. En la bibliografía se encuentran ejemplos de sinergia entre distintas interacciones no covalentes que contribuyen a la estabilización de ciertos complejos supramoleculares, y que han sido estudiados a nivel teórico y en algunas ocasiones a nivel experimental.⁹ No obstante, también podría verse afectada la estabilidad del enlace de hidrógeno por el distinto grado de solvatación de cada tipo de molécula o por la rigidez conformacional generada por el plegamiento en forma de horquilla de las glico-oligoamidas catiónicas.

Sin embargo, las diferencias conformacionales encontradas entre la glico-oligoamida catiónica con el OH2 del carbohidrato en ecuatorial (2), donde hay una mezcla conformacional en disolución acuosa, y las glico-oligoamidas catiónicas con el OH2 en axial (3 y 4), donde se define una conformación mayoritaria, apuntan a la

⁹ Cati6n- π /Enlace de hidrógeno: (a)Vijay, D.; Zipse, H.; Sastry, G. N. J. *Phys. Chem. B.* **2008**, 112, 8863-8867. (b) Lucas, X.; Estarellas, C.; Escudero, D.; Frontera, A.; Quiñonero, D.; Deyà, P. M. *ChemPhysChem* **2009**, 10, 2256-2264. π - π / Enlace de hidrógeno (c) Bravaya, K. B.; Kostko, O.; Ahmed, M.; Krylov, A. I. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 2292-2307 (d) Leist, R.; Frey, J. A.; Ottiger, P.; Frey, H-M.; Leutwyler, S.; Bachorz, R. A.; Kloppe, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 7449-7452 (e) Mignon, P.; Loverix, S.; Steyaert, J.; Geerlings, P. *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 1779-1789. (f) Ali Ebrahimi, Mostafa Habibi, Razieh Sadat Neyband and Ali Reza Gholipour *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, 11, 11424-11431. Enlace de hidrógeno e interacciones CH- π (g) Karimi, P.; Ebrahimi, A.; Bazzi, S. J. *Iran. Chem. Soc.* **2012**, 9, 991-998. (h) Mohamed, M. N. A.; Watts, H. D.; Guo, J.; Catchmark, J. M.; Kubicki, J. D. *Carb. Res.* **2010**, 345, 1741-1751.

posible existencia de cierta relación entre ambas interacciones supramoleculares. La solvatación en ambos tipos de glico-oligoamidas catiónicas debería ser similar, y en ambos derivados existe cierto porcentaje de conformación plegada, por lo que la rigidez conformacional existiría en cualquier caso.

No es la primera vez que observamos en nuestro grupo una diferencia de comportamiento de este tipo entre glico-oligoamidas con el OH2 en ecuatorial y con el OH2 en axial. Tenemos precedentes de estudios conformacionales realizados con glico-oligoamidas neutras de D-manosa, D-talosa con el OH2 en axial, con capacidad de establecer redes cooperativas de enlace de hidrógeno, y con derivados de D-glucosa y D-galactosa, con el OH2 en ecuatorial.¹⁰ Los resultados de los derivados neutros con el OH2 en axial, demuestran la existencia del enlace de hidrógeno en agua y muestran a su vez, una mejor definición de la conformación en forma de horquilla, comparado con sus análogos con el OH2 en ecuatorial.

4.2.4 Cálculos teóricos

En esta tesis, también se ha querido abordar el estudio conformacional y la coexistencia de interacciones supramoleculares a nivel teórico, con objeto de intentar entender con más detalle los factores que influyen en la definición de una conformación concreta. El estudio teórico que se detalla a continuación se ha llevado a cabo en colaboración con el grupo de Dr. Iñaki Tuñón, de la Universidad de Valencia.

El estudio teórico de las estructuras de los compuestos analizados en esta tesis doctoral se ha realizado utilizando la teoría del funcional de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés).¹¹ En concreto se ha seleccionado el método de cálculo B3LYP¹² que incorpora una parte de la energía de intercambio calculada a nivel Hartree-Fock. Los cálculos se han realizado empleando el conjunto de base 6-31+G(d,p) que incorpora funciones difusas en los átomos diferentes del hidrógeno, así como funciones de polarización en todos los átomos.

En las estructuras estudiadas la energía de dispersión puede suponer una contribución importante para la estabilización de estructuras compactas donde se produzcan interacciones entre diferentes fragmentos (como ocurre en las estructuras plegadas de las horquillas). En general los métodos DFT, y en concreto el método B3LYP, no incorporan correctamente esta contribución energética por lo que es necesario incluir correcciones empíricas para tratar estas interacciones. En esta tesis doctoral se ha optado por el método B3LYP-D3¹³ que incorpora una corrección obtenida en función de distancias internucleares de pares y tripletes de átomos para tener en cuenta los efectos de tres cuerpos.

¹⁰ Blázquez-Sánchez, M. T.; Marcelo, F.; Fernández-Alonso, M. C.; Poveda, A.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 17640–17652.

¹¹ *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*. Robert G. Parr and Yang Weitao. Oxford University Press, 1994.

¹² (a) Becke, A.D. *J.Chem.Phys.* **1993**, 98, 5648-5652. (b) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R.G. *Phys. Rev. B* **1988**, 37, 785-789.

¹³ Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S.; Krieg, S. *J. Chem. Phys.* **2010**, 132, 154104.

El efecto del disolvente se ha incorporado mediante el método de continuo SMD,¹⁴ que incluye el efecto de interacciones electrostáticas y no electrostáticas. El soluto se sitúa en el interior del disolvente en una cavidad construida a partir del solapamiento de esferas centradas en cada una de las posiciones atómicas. El disolvente se caracteriza por el valor de la constante dieléctrica (78.4 para el caso del agua) y un conjunto de parámetros de superficie que permiten evaluar empíricamente las contribuciones no electrostáticas (dispersión, repulsión y cavitación).

Las optimizaciones de geometría de las diferentes estructuras caracterizadas se realizaron a partir de geometrías iniciales obtenidas con el programa Chemcraft.¹⁵ La optimización geométrica se llevó a término utilizando el algoritmo de Berny hasta alcanzar los criterios de convergencia establecidos por defecto en el programa Gaussian09¹⁶ con el que se realizaron todos los cálculos presentados. Una vez obtenida la geometría optimizada se analizó la matriz de derivadas segundas, caracterizando la estructura como mínimo cuando todas y cada una de las frecuencias obtenidas tras su diagonalización resultaron ser positivas. A partir de estas frecuencias y utilizando el modelo de rotor rígido y oscilador armónico¹⁷ se obtuvieron las energías libres asociadas a cada uno de los mínimos encontrados.

En primer lugar se quiso plantear mediante modelos computacionales el estudio de los dos posibles plegamientos de la cara α del carbohidrato sobre el indol de ambas glico-oligoamidas catiónicas D-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (**3**) y L-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (**4**). Como punto de partida previo a la optimización de geometrías, se generó una estructura inicial, con restricciones basadas en algunos de los datos conformacionales obtenidos por RMN, tales como la orientación de la cara α del carbohidrato hacia el indol, un ángulo de la amida anomérica aproximado a los 180° y la orientación de los metilos de los pirroles hacia un arco de la molécula, mientras los NH se orientan hacia el contrario. Para evaluar a nivel teórico la presencia del enlace de hidrógeno intramolecular $NH_5 \cdots OH_2$ y la existencia de las interacciones $CH-\pi$ que estabilizan la conformación en horquilla, se han medido características estructurales como distancias clave y ángulos en cada una de las estructuras obtenidas.

Para el derivado de D-manosa (**3**) con el llamado plegamiento A, que sitúa los centros C5 y C6 del carbohidrato hacia el arco NH de la molécula, y los centros C2 y C3

¹⁴ Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem. B*, **2009**, 113, 6378–6396.

¹⁵ Andrienko, G. A. Chemcraft 1.8, 2014

¹⁶ Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian 09, Revision C.01; Wallingford CT, 2009.

¹⁷ Statistical Mechanics, D. A McQuarrie, University Science Books, 2000

hacia el NH, se obtiene una estructura que posiciona más cerca del indol el plano del carbohidrato formado por los protones H1, H5, H6 y H6' (Figura 4.22 A y Tabla 4.14). La distancia del enlace de hidrógeno NH5...OH2 obtenida es de 2.68 Å con un ángulo de -11.52°. Además en esta estructura, sorprendentemente, aparece un enlace de hidrógeno adicional, que no ha sido detectado a nivel experimental, entre el carbonilo de la amida del pirrol de la hebra indol, y el grupo NH₃⁺ del fragmento γ , que se encuentran a una distancia de 1.871 Å. En cuanto al enlace de hidrógeno se refiere, la distancia NH5-OH2 encontrada en esta estructura está dentro del rango de distancias posibles de enlace de hidrógeno,¹⁸ además el ángulo de enlace también podría apoyar la presencia de enlace de hidrógeno en esta estructura. No obstante, esta estructura no encaja con los datos experimentales obtenidos por RMN (nOes y desplazamientos químicos inducidos), que apuestan por una implicación mayor de los protones H2 y H3 del carbohidrato en las interacciones CH- π , en lugar de H5 y H6. Esta estructura, sitúa a H5 justo encima del anillo de 6 miembros del indol, siendo el protón más cercano al centro del anillo con una distancia de 2.947 Å (Tabla 4.14). Esto implicaría una participación mayoritaria de este protón en las interacciones CH- π , pero a nivel experimental, esto no es lo observado.

En la estructura obtenida para el plegamiento **B** la situación es diferente. Este plegamiento sitúa los centros C2 y C3 de la D-manosa hacia el arco NH de la molécula. En esta ocasión el plano del carbohidrato más cercano a la superficie del indol es el formado por los protones H1, H2 y H3 (Figura 4.16 B y Tabla 4.14). El protón H3 se sitúa en el centro del anillo de seis miembros del indol, a una distancia del centroide de este anillo de 2.495, propicia para dar lugar a interacciones CH- π .¹⁹ Además, la distancia de enlace de hidrógeno NH5...OH2 se acorta a 2.386 Å, y el ángulo de enlace sigue siendo pequeño (26.52°), propiciando la formación de este enlace de hidrógeno. Sin embargo en esta estructura, el grupo NH₃⁺ del fragmento γ , se dispone del lado opuesto al carbonilo con el cual se formaba un enlace de hidrógeno adicional en el plegamiento **A**, situándose demasiado alejado como para dar lugar al enlace de hidrógeno. Esta estructura del plegamiento **B**, se ajusta en gran medida a los datos experimentales obtenidos por RMN, tanto por la cercanía de los protones del carbohidrato H2 y H3 a la nube π del indol, como por la distancia corta entre el NH5 y el OH2, adecuada para propiciar el enlace de hidrógeno.

A nivel energético, hay una diferencia entre ambos plegamientos, estando favorecido el plegamiento **B** frente al plegamiento **A**, con una diferencia de energía interna de -0.13 y de energía libre de -1.15 a favor del plegamiento **B**. Estos resultados apoyan la hipótesis planteada a partir de los datos experimentales, de que en disolución acuosa hay una conformación mayoritaria correspondiente al plegamiento **B** del derivado de D-manosa (**3**).

¹⁸ Jeffrey, G. A. *Hydrogen Bonding in Biological Structures* Springer-Verlag, 1991.

¹⁹ Tayubi, I. A.; Sethumadhavan, R. J. *Pharm. Pharm. Sci.* **2011**, 3, 212-218.

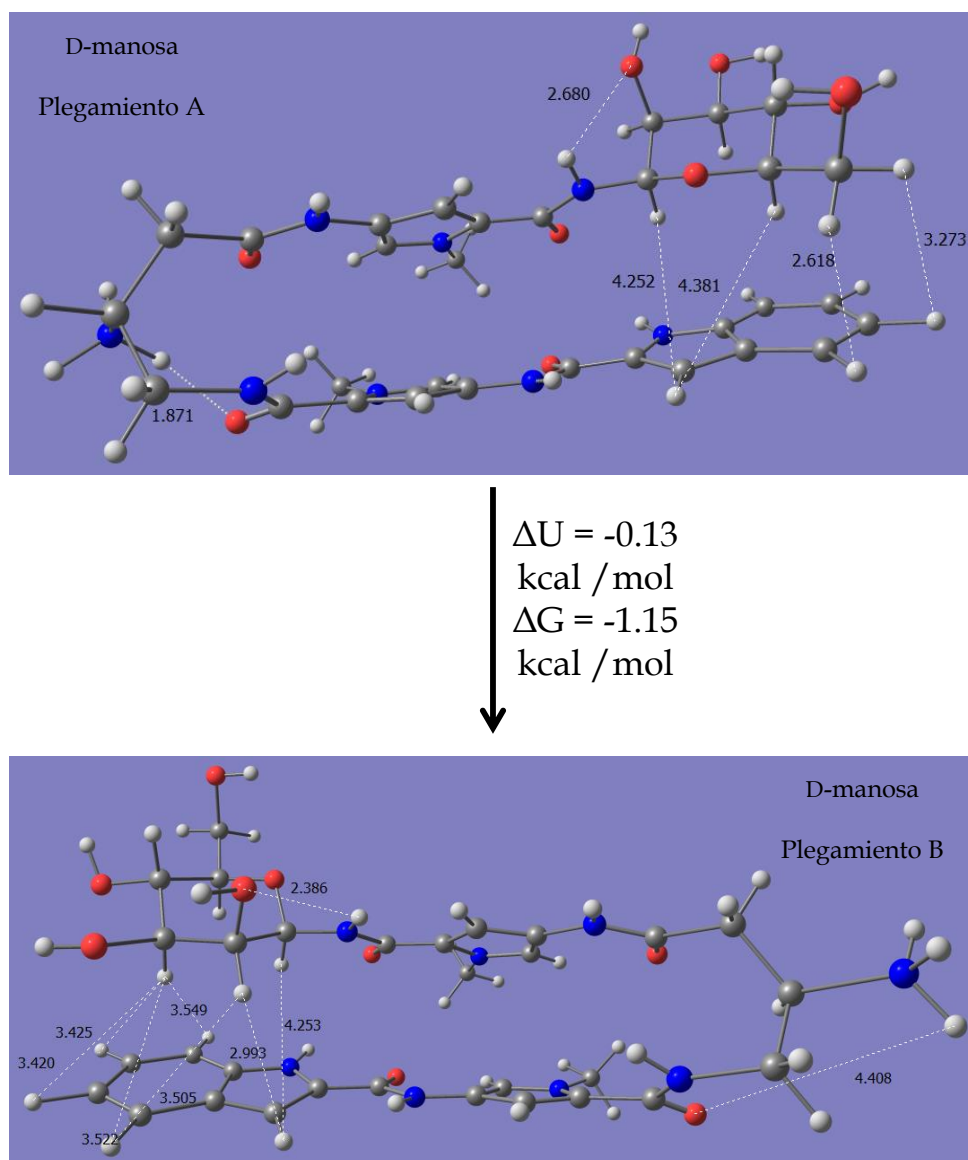


Figura 4.22 Estructuras de mínima energía con geometrías optimizadas obtenidas para los dos posibles plegamientos de la glico-oligoamida catiónica D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3). La estructura superior corresponde al plegamiento A y la inferior al plegamiento B. Las distancias más relevantes están indicadas por las líneas punteadas y expresadas en Å.

Para el derivado de L-manosa (**4**), en el plegamiento **A**, que sitúa los centros C5 y C6 del carbohidrato hacia el arco NH de la molécula, la situación es similar a la encontrada con el otro diastereomero. Existe una mayor cercanía del H5 del carbohidrato al indol (2.363 Å) (Figura 4.23 A, Tabla 4.14). Esta estructura sugeriría una mayor implicación de este protón en las interacciones CH- π , sin embargo los resultados experimentales de RMN no indican esto. En este caso, la distancia de enlace de hidrógeno intramolecular NH5...OH2 (2.753 Å) y el ángulo (11.74°) también son los adecuados para que la formación del enlace. En cuanto al enlace de hidrógeno adicional entre el carbonilo de la amida y el grupo NH₃⁺ del fragmento γ , que se observaba en el plegamiento **A** del derivado de D-manosa, en esta estructura no se observa. En este plegamiento **A** del derivado de L-manosa, el NH₃⁺ del fragmento γ queda alejado del carbonilo (4.389 Å) y orientados hacia lados opuestos, por lo que no

se puede formar el enlace de hidrógeno. Esto es consecuencia de la diferente quiralidad del carbohidrato. Para el mismo tipo de plegamiento, en este caso el **A**, sobre la cara α del carbohidrato se obtienen estructuras tridimensionales opuestas, con el derivado de D-manosa (**3**) y con el de L-manosa (**4**). Así, para el mismo tipo de plegamiento en los dos derivados, el grupo NH_3^+ del fragmento γ , queda orientado hacia direcciones opuestas.

En la estructura obtenida para el plegamiento B, del derivado L-manosa (**4**), se observa una mayor cercanía de los protones H2 y H3 hacia el indol, permitiendo su implicación directa en las interacciones CH- π que estabilizan el plegamiento de la conformación plegada. Esto está en concordancia con los datos experimentales de RMN, que sugerían una participación activa de estos átomos en el plegamiento de la molécula. Además, la distancia del enlace de hidrógeno intramolecular $\text{NH}_5 \cdots \text{OH}_2$ (2.415 Å) es menor que en el otro plegamiento y el ángulo de enlace sigue siendo pequeño (-30.64°). En este plegamiento, también se observa el enlace de hidrógeno entre el carbonilo y el NH_3^+ del fragmento γ , que quedan situados a una distancia adecuada (1.837 Å) y orientados en la misma dirección.

Esta vez, la diferencia energética entre los dos plegamientos aumenta significativamente (Figura 4.23). Hay una diferencia en energía interna de -4.93 y de energía libre de -4.69 , a favor del plegamiento **B** frente al **A**. Estos datos de energía corroboran los resultados experimentales, indicando una mayor estabilización de la horquilla en el plegamiento **B**, y por lo tanto la existencia de esta conformación como mayoritaria en disolución.

Si se comparan la estabilización de los dos plegamientos **B** de ambos derivados, se observa una mayor diferencia energética entre plegamientos en el caso de la glico-oligoamida derivada de L-manosa. El origen de la variación en las diferencias energéticas entre plegamientos (**A** y **B**) encontrada para los dos derivados (**3** y **4**), puede encontrarse en la presencia del enlace de hidrógeno adicional $\text{CO} \cdots \text{NH}_3^+$. En el caso del derivado de D-manosa, este enlace de hidrógeno se da en el plegamiento **A**, y en el caso del derivado de L-manosa, se encuentra en el plegamiento **B**. Este enlace de hidrógeno adicional puede estar contribuyendo a la mayor estabilización de la conformación plegada **B** para el derivado L-Man-Py- $\gamma[(R)\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind (**4**). A la vista de estos resultados, cabe destacar que las fuerzas que gobiernan sobre el plegamiento de las glico-oligoamidas catiónicas derivada de D-manosa (**3**) y L-manosa (**4**), son las interacciones CH- π con el plano formado H1, H2 y H3 de la cara α del carbohidrato y el enlace de hidrógeno $\text{NH}_5 \cdots \text{OH}_2$. La demostración de esto, se encuentra en el ejemplo del derivado de D-manosa. A pesar de que el plegamiento **A** tiene el enlace un hidrógeno adicional $\text{CO} \cdots \text{NH}_3^+$ y posibles interacciones favorables CH- π con el protón H5, a nivel experimental, se observa como confórmero mayoritario el correspondiente al plegamiento **B**, poniendo de manifiesto la importancia de las interacciones CH- π con los protones H1, H2 y H3 de la manosa y la formación del enlace de hidrógeno $\text{NH}_5 \cdots \text{OH}_2$.

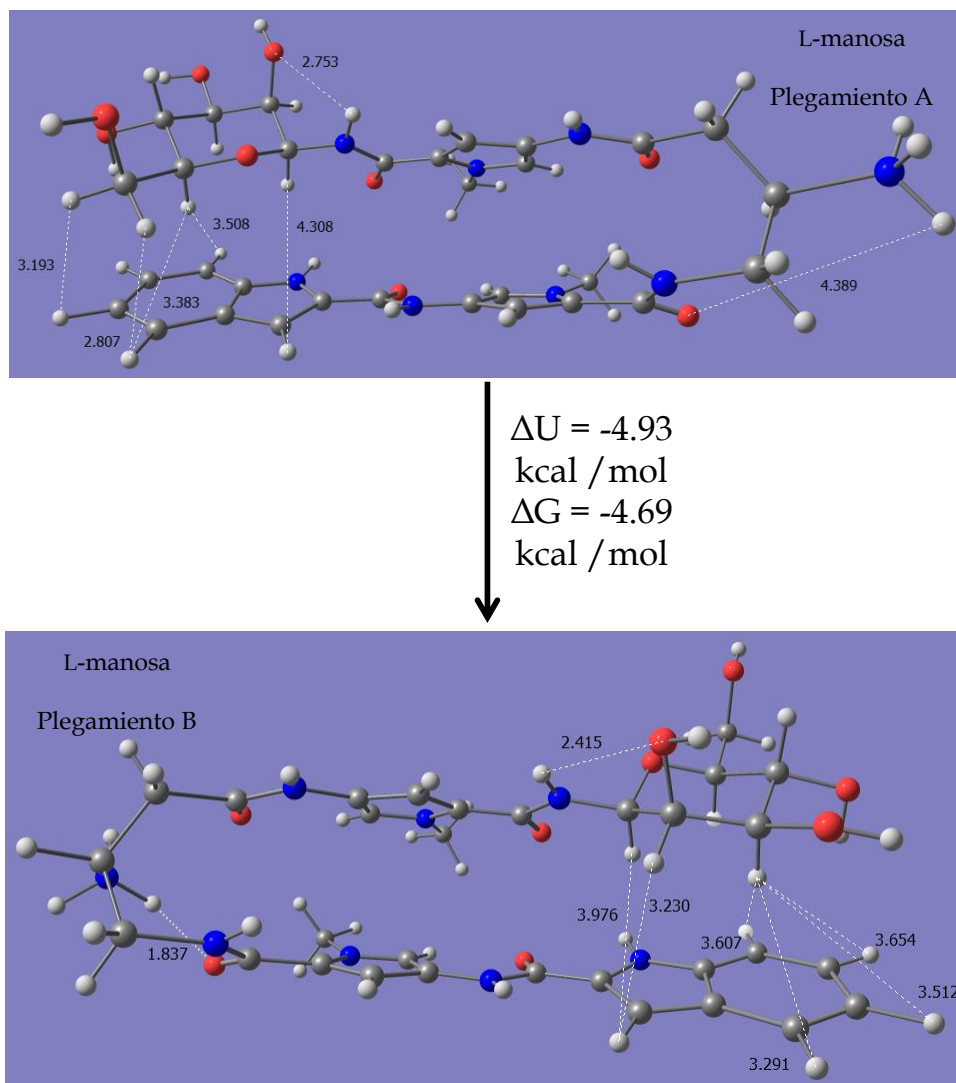


Figura 4.23 Estructuras de mínima energía con geometrías optimizadas obtenidas para los dos posibles plegamientos de la glico-oligoamida catiónica L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4). La estructura superior corresponde al plegamiento A y la inferior al plegamiento B. Las distancias más relevantes están indicadas por las líneas punteadas y expresadas en Å.

Tabla 4.14 Distancias más relevantes de las los dos plegamientos A y B, para las dos glico-oligoamidas catiónicas D-Man-Py- γ -(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) y L-Man-Py- γ -(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4).

Distancias (Å)	DMan+A	DMan+B	LMan+A	LMan+B
NH \cdots OH2	2.680	2.386	2.753	2.415
OH2 \cdots OH3	2.398	2.456	2.455	2.473
OH3 \cdots OH4	2.453	2.525	2.502	2.564
NH ₃ \cdots CO	1.871	4.408	4.389	1.837
H2 \cdots Ind3	6.572	2.993	6.695	3.230
H5 \cdots Ind7	3.653	3.608	3.508	3.005
H6 \cdots Ind4	2.618	8.035	2.807	8.035
H3 \cdots Ind7	3.738	3.549	3.220	3.607
H3 \cdots Ind6R ^a	-	2.495	-	2.372
H5 \cdots Ind6R ^a	2.524	-	2.363	-
H1 \cdots Ind5R ^a	2.947	2.896	2.916	2.756

^a La notación Ind5R corresponde al centro de masas del anillo de 5 miembros del indol e Ind6R corresponde al centro de masas del anillo de 6 miembros del indol.

Posteriormente, con el objeto de abordar mediante modelos computacionales la posible influencia de las interacciones CH- π en la formación o estabilización de los enlaces de hidrógeno intramoleculares del carbohidrato, se realizaron cálculos usando el Gaussian 09. Los cálculos realizados hasta el momento han dado lugar a unas estructuras optimizadas que nos han permitido evaluar las distancias entre los hidrógenos del carbohidrato y el indol así como la distancia de enlace de hidrógeno NH5 \cdots OH2. En la actualidad se está explorando el uso de la teoría de átomos en moléculas para caracterizar estas interacciones basándose en la densidad de carga electrónica negativa, obteniendo de este modo los puntos críticos entre los enlaces de hidrógeno y las interacciones CH- π .

Por último, también se han realizado modelos teóricos con el derivado de xilosa. A nivel experimental, los resultados encontrados para xilosa difieren mucho de los obtenidos para los derivados de manosa, en cuanto a que estos últimos permiten definir con mayor detalle el tipo de plegamiento y la orientación del carbohidrato. A nivel teórico, se ha partido de los escasos datos experimentales y se han empleado unas coordenadas iniciales que derivan de las estructuras de manosa donde se ha sustituido el carbohidrato correspondiente. Se han encontrado problemas a la hora de optimizar las conformaciones plegadas de xilosa, dado que a nivel experimental no ha sido posible definir la cara del carbohidrato orientada hacia el indol ni el tipo de plegamiento, por lo que en principio habría cuatro posibles conformaciones diferentes. Hasta el momento, se han obtenido dos estructuras diferentes con distintas características en cuanto a la orientación del carbohidrato y plegamiento sin que ellas apoyen los limitados datos estructurales en disolución.

4.3 Estudios de interacción de las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa y L-manosa con polímeros de ADN empleando distintas técnicas biofísicas

La quiralidad es un concepto fundamental en los procesos de reconocimiento molecular en sistemas biológicos. En el caso del ADN está intrínsecamente presente, tanto a nivel molecular como a nivel supramolecular. En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia de llegar a comprender la interacción selectiva de moléculas quirales con ADN o ARN, para poder desarrollar nuevos fármacos y nuevas herramientas a nivel biológico. En varios casos la quiralidad de los ligandos ha sido un punto crucial en el modo de unión de estos al ADN, e incluso se han descrito cambios conformacionales del ADN en disolución, de B a Z, inducidos por una pareja de enantiómeros. Se ha demostrado así la relevancia de la quiralidad y ha quedado patente la necesidad de tratar de entender cómo esta afecta a los mecanismos y efectividad del reconocimiento de ácidos nucleicos.²⁰

En este apartado el objetivo principal es obtener información acerca del papel que desempeña el de carbohidrato, en el proceso de interacción con polímeros de ADN, mediante el uso de RMN y otras técnicas biofísicas como microcalorimetría o dicroísmo circular. En concreto, se tratará de estudiar la influencia de las redes cooperativas de enlace de hidrógeno de las glico-oligoamidas catiónicas con D y L-manosa, en su interacción con el ADN, tanto a nivel de afinidad como estructural.

4.3.1 Estudios de interacción de β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) y β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) con polímeros de ADN por ¹H-RMN

La primera aproximación que se realizó en los estudios de interacción fue mediante el uso de ¹H-RMN. Se llevaron a cabo distintos experimentos de interacción empleando polímeros sintéticos de ADN, Poly(dA-dT)₂ y Poly(dG-dC)₂. De nuevo, el uso de estos polímeros permitió aprovechar las diferentes propiedades físicas entre las macromoléculas y las moléculas pequeñas para seguir el proceso de unión de las glico-oligoamidas catiónicas y el ADN. A medida que el ligando se va uniendo al ADN, adquiere las propiedades físicas de la macromolécula y sus señales de resonancia se ensanchan progresivamente. Así, se empleó la metodología descrita en el capítulo anterior, en la cual se mantiene constante la concentración de glico-oligoamida catiónica en el tubo de RMN mientras se adicionan cantidades crecientes del correspondiente polímero de ADN. En cada punto se registran espectros de ¹H-RMN y se evalúa la interacción de los ligandos con el ADN mediante el seguimiento de sus señales de RMN a cada relación molar.

4.3.1.1 Estudios de selectividad de secuencia de las glico-oligoamidas catiónicas 3 y 4

En primer lugar se realizaron valoraciones de ambas glico-oligoamidas de D y L-manosa **3** y **4** con Poly(dA-dT)₂, para evaluar a nivel cualitativo su afinidad por secuencias AT (Figura 4.24 y Figura 4.25).

²⁰ Corradini, R.; Sforza, S.; Tedeschi, T.; Marchelli, R. *Chirality* **2007**, 19, 269–294.

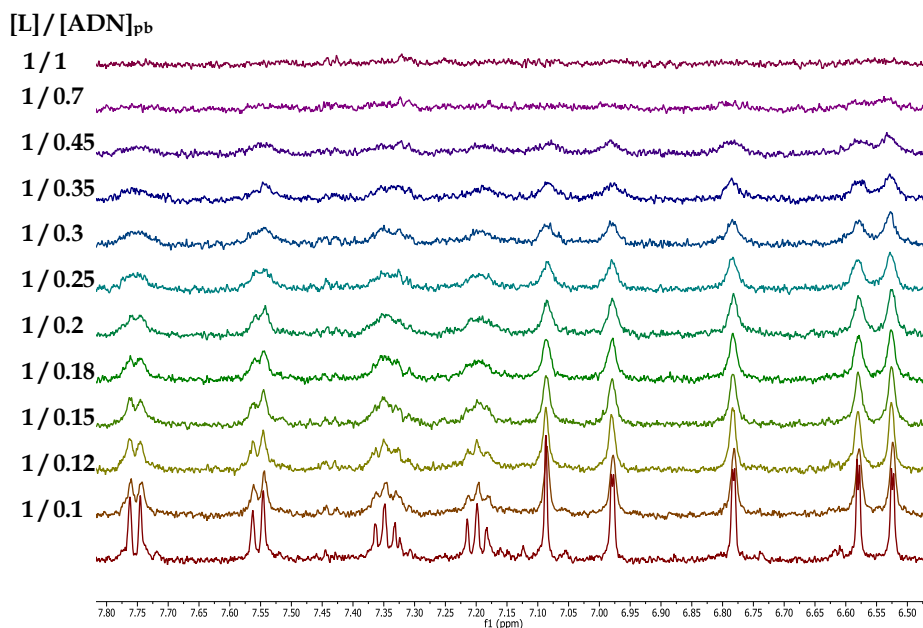


Figura 4.24 Ampliación de la zona aromática del espectro ^1H -RMN de la titulación de la glico-oligoamida catiónica de D-manosa **3** ($160\ \mu\text{M}$) con Poly(dA-dT) $_2$. Espectro en D_2O , tampón fosfato $10\ \text{mM}$, $\text{pH}=7.3$, a $25\ ^\circ\text{C}$

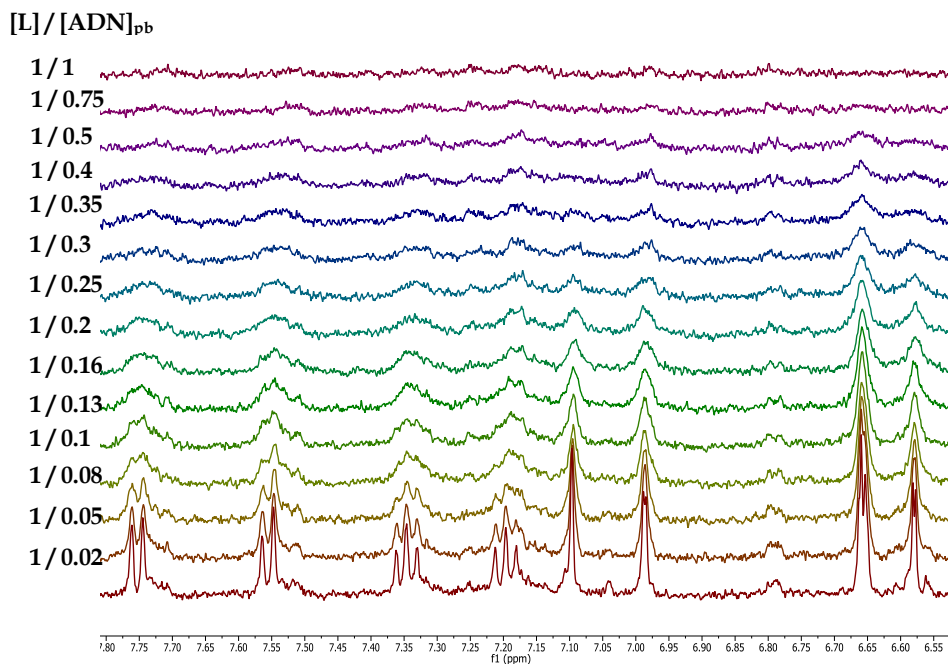


Figura 4.25 Ampliación de la zona aromática del espectro ^1H -RMN de la titulación de la glico-oligoamida catiónica de L-manosa **4** ($170\ \mu\text{M}$) con Poly(dA-dT) $_2$. Espectro en D_2O , tampón fosfato $10\ \text{mM}$, $\text{pH}=7.3$, a $25\ ^\circ\text{C}$

En los dos experimentos se observa el ensanchamiento progresivo de las señales de las glico-oligoamidas **3** y **4** a medida que aumenta la concentración de Poly(dA-dT) $_2$ en el medio. Este hecho indica la unión de ambos ligandos al ADN. En ambos casos las señales desaparecen por completo del espectro antes de llegar a una relación molar 1/1 en pares de bases. Teniendo en cuenta que, de acuerdo con estudios previos de las glico-oligoamidas neutras, una glico-oligoamida ocuparía tres pares de bases, para una

relación molar 1/1, es evidente que las resonancias desaparecen antes de llegar al punto final de saturación del experimento, en el cual habría un exceso de macromolécula y todo el ligando estaría unido. Además, si se presta atención a la forma de línea, se observa que no solo hay un ensanchamiento de la señal, sino también pérdida de intensidad sin variación de desplazamiento químico. Por lo tanto, estos datos apuntan a una situación de intercambio intermedio-lento que está asociada con ligandos de elevada afinidad. La imposibilidad de alcanzar el punto final de saturación en la titulación, sumado a la situación de intercambio intermedio-lento del sistema, hace que no sea posible realizar una cuantificación de la interacción.

No obstante, si se comparan a nivel cualitativo las intensidades relativas (I_{obs}/I_0) de ambas glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4**, en el mismo punto de la titulación, por ejemplo a una relación molar $[L]/[\text{ADN}] = 1/0.3$, se observa una ligera diferencia. En general, la intensidad relativa de las señales en el experimento del derivado de L-manosa **4** es menor que las intensidades de su diastereómero **3**, en el mismo punto del experimento. Esta diferencia podría sugerir una ligera variación en las afinidades de β -D-Man-Py- $\gamma[(R)\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind (**3**) y β -L-Man-Py- $\gamma[(R)\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind (**4**) por el Poly(dA-dT)₂. Para poder cuantificar la interacción y confirmar esta diferencia de afinidades será necesario recurrir a otro tipo de técnicas biofísicas con márgenes de detección de afinidades más adecuados al estudio de estos sistemas.

Una vez evaluada la interacción de los derivados de D-manosa **3** y L-manosa **4** con Poly(dA-dT)₂, se realizaron titulaciones con poly(dG-dC)₂ para estudiar la selectividad de secuencia de los nuevos ligandos. Se registraron espectros ¹H-RMN (D₂O, tampón fosfato 10 mM, pH=7.3, a 25 °C) consecutivos tras las adiciones crecientes de poly(dG-dC)₂, manteniendo constante la concentración de β -D-Man-Py- $\gamma[(R)\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind (**3**) y β -L-Man-Py- $\gamma[(R)\text{NH}_3^+]$ -Py-Ind (**4**) respectivamente en cada experimento. En los dos experimentos (Figura 4.26 y Figura 4.27) se observa el ensanchamiento progresivo de las señales de resonancia del ligando, lo cual es una prueba inequívoca de que ambos derivados de D y L-manosa se unen también a secuencias de ADN compuestas por pares de bases GC. Sin embargo, si se comparan estos experimento con los realizados con Poly(dA-dT)₂, es necesario alcanzar una concentración más elevada de Poly(dG-dC)₂ en disolución para la desaparición casi completa de las señales del espectro. Por lo tanto, cualitativamente, estos ligandos siguen mostrando preferencia por las secuencias de ADN ricas en AT. Otra diferencia que se aprecia en la comparación con el experimento con Poly(dA-dT)₂, es que en la titulación con este polímero de ADN las resonancias no sufren variación en sus desplazamientos químicos mientras que en los experimentos con Poly(dG-dC)₂ se observan variaciones. Esto sugiere un cambio en el régimen de intercambio, de intermedio-lento a intermedio rápido, pudiendo estar relacionado con la menor afinidad de los ligandos por Poly(dG-dC)₂ que por Poly(dA-dT)₂.

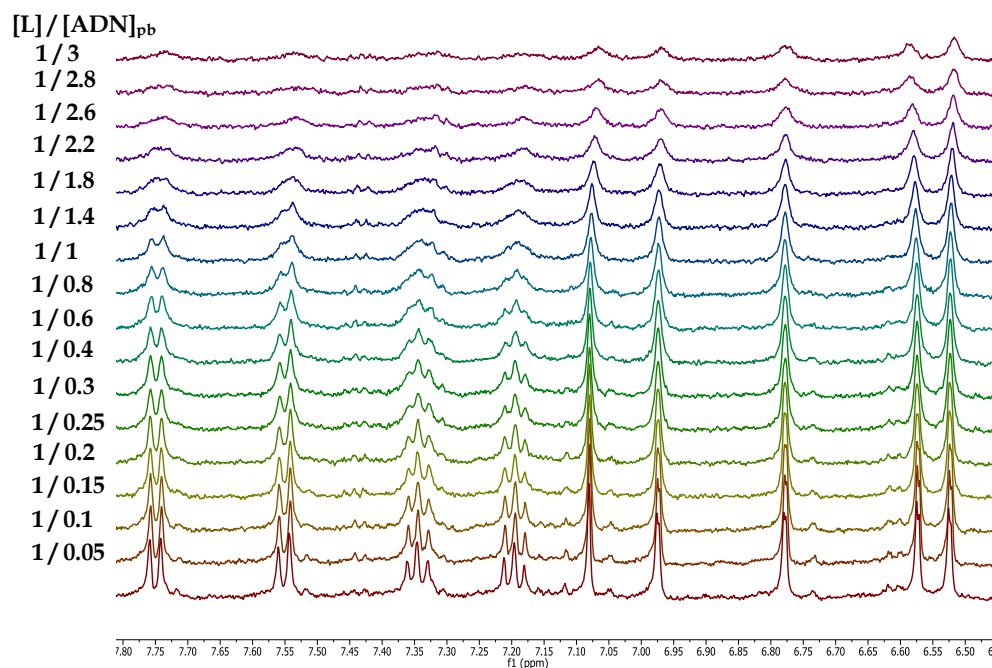


Figura 4.26 Ampliación de la zona aromática del espectro ^1H -RMN de la titulación de la glico-oligoamida catiónica de D-manosa (**3**) ($180\ \mu\text{M}$) con Poly(dG-dC)_2 . Espectro en D_2O , tampón fosfato $10\ \text{mM}$, $\text{pH}=7.3$, a $25\ ^\circ\text{C}$

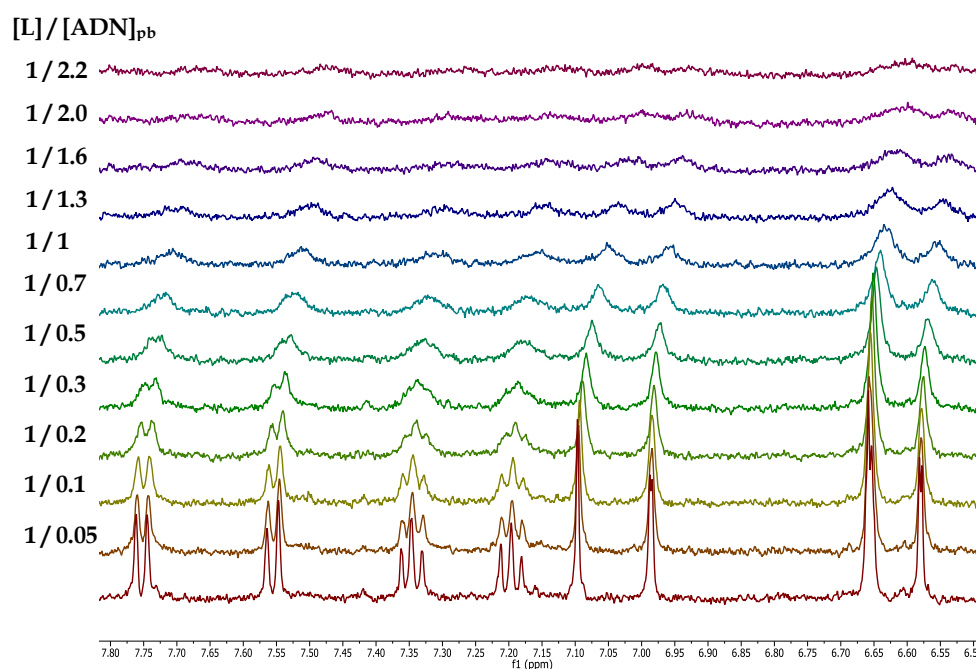


Figura 4.27 Ampliación de la zona aromática del espectro ^1H -RMN de la titulación de la glico-oligoamida catiónica de L-manosa (**4**) ($190\ \mu\text{M}$) con Poly(dG-dC)_2 . Espectro en D_2O , tampón fosfato $10\ \text{mM}$, $\text{pH}=7.3$, a $25\ ^\circ\text{C}$

Adicionalmente, en estos experimentos con Poly(dG-dC)_2 , cabe destacar la diferencia de comportamiento existente entre β -D-Man-Py- γ [(R) NH_3^+]-Py-Ind (**3**) y β -L-Man-Py- γ [(R) NH_3^+]-Py-Ind (**4**). Mientras que en el caso del derivado de L-manosa **4** sus

señales desaparecen con una relación molar $[L]/[\text{Poly(dG-dC)}_2]$ de 1/2.2, para esa misma relación molar las señales del derivado de D-manosa **3** son todavía visibles. Es necesario añadir una mayor concentración del polímero de ADN para que desaparezcan sus señales del espectro. Estas diferencias sugieren cualitativamente afinidades distintas para ambas glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4** frente al mismo polímero de ADN, mostrando el derivado de L-manosa **4** mayor afinidad por el Poly(dG-dC)_2 . Así, se puede sugerir, que el carbohidrato puede tener cierta contribución en la modulación la interacción de las glico-oligoamidas catiónicas con los distintos polímeros de ADN. Por lo tanto, el carbohidrato podría tener cierta responsabilidad en la variación de la selectividad de secuencia de los ligandos. La glico-oligoamida catiónica derivada de D-manosa **3** muestra una mayor selectividad de secuencia hacia pares de bases AT, mientras que, la glico-oligoamida de L-manosa **4** resultó ser menos selectiva al unirse a secuencias GC con mayor efectividad que su diastereómero.

4.3.1.2 Comparación entre las glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4** y sus análogas neutras.

En esta ocasión, también se quiso evaluar la afinidad de las glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4** frente a la de sus análogas neutras (**35** y **36**). Para ello, se realizó un experimento de competición entre β -D-Man-Py- γ [(R) NH_3^+]-Py-Ind (**3**) y β -D-Man-Py- γ -Py-Ind (**35**), y también entre β -L-Man-Py- γ [(R) NH_3^+]-Py-Ind (**4**) y β -L-Man-Py- γ -Py-Ind (**36**) frente a Poly(dA-dT)_2 , ya que las glico-oligoamidas neutras no forman complejos estables con Poly(dG-dC)_2 . Para cada experimento se preparó una mezcla de ambas glico-oligoamidas, la catiónica y la neutra, derivadas del mismo carbohidrato, a una misma concentración. A continuación, se añadieron cantidades crecientes de Poly(dA-dT)_2 , y se registraron espectros $^1\text{H-RMN}$ consecutivos para monitorizar las variaciones en las resonancias de cada compuesto. En las siguientes figuras se muestran las ampliaciones de la región aromática de los experimentos de competición de los derivados de D-manosa (Figura 4.28) y los de L-manosa (Figura 4.29).

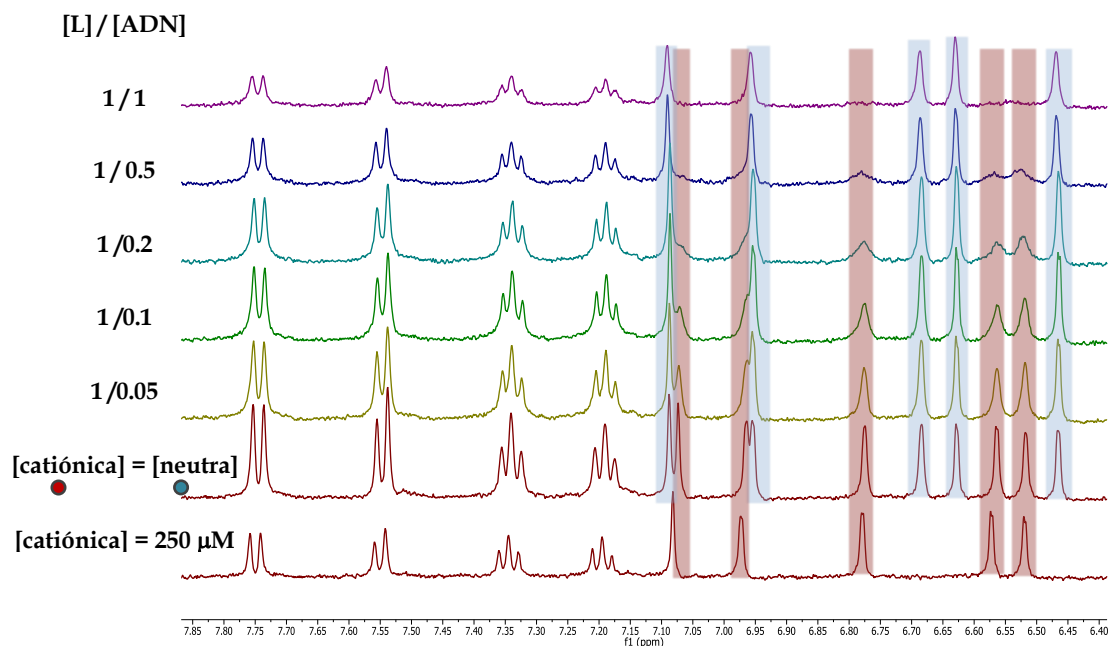


Figura 4.28 Ampliación de la zona aromática de los espectros ^1H -RMN del experimento de competición de las glico-oligoamidas $\beta\text{-D-Man-Py-}\gamma\text{-(R)NH}_3^+\text{-Py-Ind}$ (**3**) y su análoga neutra $\beta\text{-D-Man-Py-}\gamma\text{-Py-Ind}$ frente a Poly(dA-dT)_2 . Espectro en D_2O , tampón fosfato 10 mM, pH=7.3 a 25 °C

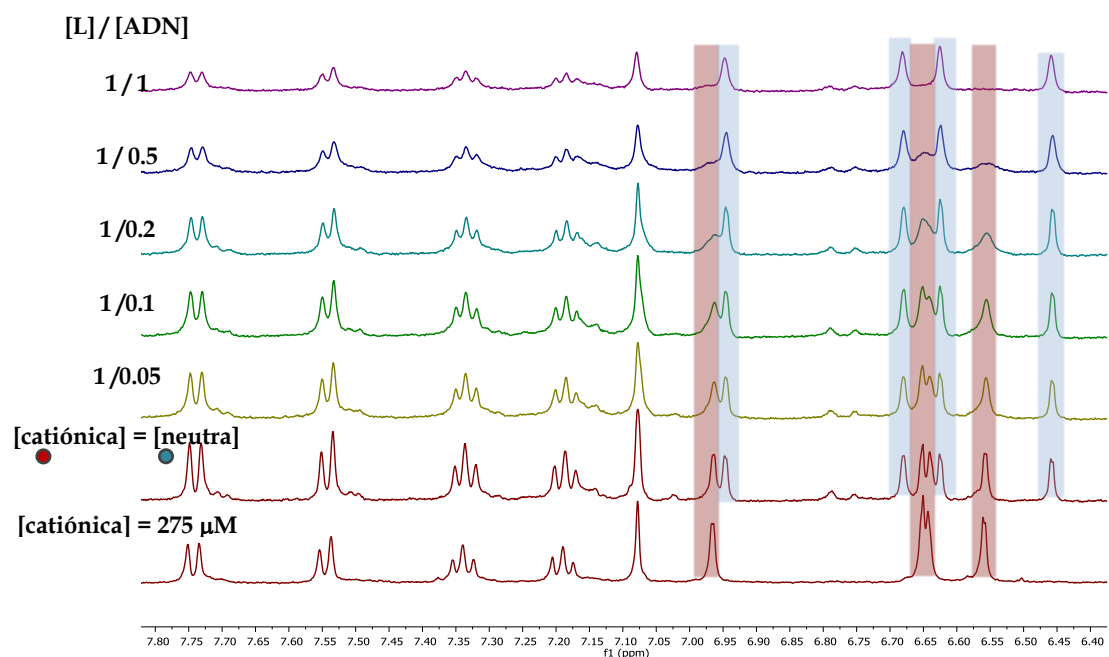


Figura 4.29 Ampliación de la zona aromática de los espectros ^1H -RMN del experimento de competición de las glico-oligoamidas $\beta\text{-L-Man-Py-}\gamma\text{-(R)NH}_3^+\text{-Py-Ind}$ (**4**) y su análoga neutra $\beta\text{-L-Man-Py-}\gamma\text{-Py-Ind}$ frente a Poly(dA-dT)_2 . Espectro en D_2O , tampón fosfato 10 mM, pH=7.3 a 25 °C

En ambos experimentos se observa la misma tendencia. Las señales correspondientes a las glico-oligoamidas catiónicas (**3** y **4**) se ensanchan y pierden intensidad progresivamente con las adiciones crecientes de Poly(dA-dT)_2 hasta que desaparecen, mientras las resonancias pertenecientes a las glico-oligoamidas neutras permanecen prácticamente sin modificaciones en su anchura e intensidad. Por lo tanto ambas, la glico-oligoamida neutra y su análoga catiónica compiten por los sitios de

unión al ADN. La desaparición clara de las resonancias de las glico-oligoamidas catiónicas antes de que se vean afectadas las señales de las neutras, indica la unión preferente de los derivados catiónicos al Poly(dA-dT)₂ y por tanto su mayor afinidad por el ADN.

4.3.1.3 Experimento de competición de β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) y β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) con netropsina frente a poly(dA-dT)₂

Con el objetivo de obtener información sobre el sitio de unión de estos ligandos en el ADN, se llevaron a cabo experimentos de competición por RMN con netropsina, ligando específico del surco menor del ADN con una elevada constante de asociación con secuencias AT. La metodología empleada explicada en detalle en el capítulo anterior, consiste en formar, el complejo de glico-oligoamida catiónica con Poly(dA-dT)₂, para posteriormente añadir cantidades crecientes de una disolución de netropsina (10⁻² M). Si ambos ligandos comparten sitios de unión, la netropsina desplazará a la glico-oligoamida catiónica por ser un ligando más eficaz. En la siguiente Figura 4.30 se muestra como ejemplo el experimento de competición de β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4). El experimento con la glico-oligoamida de D-manosa y netropsina se muestra en el anexo del capítulo.

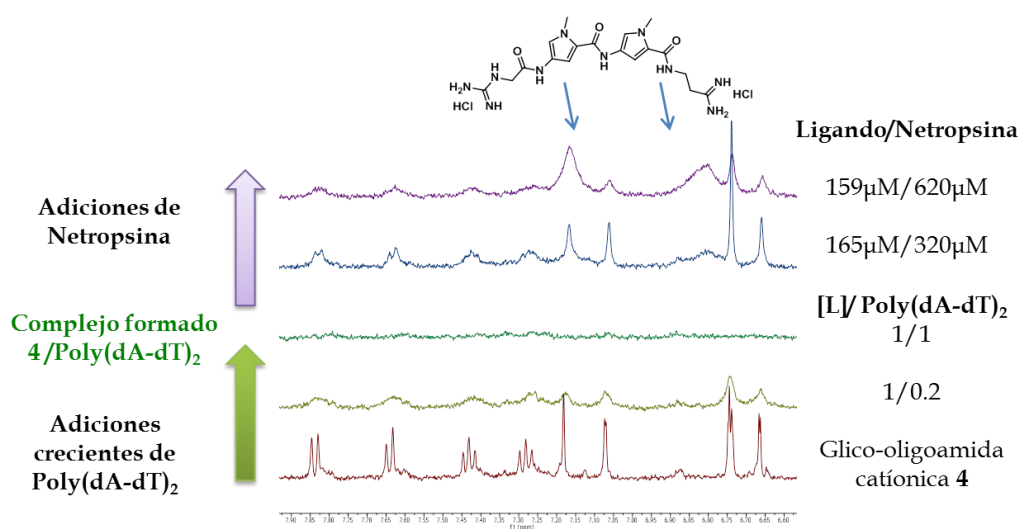
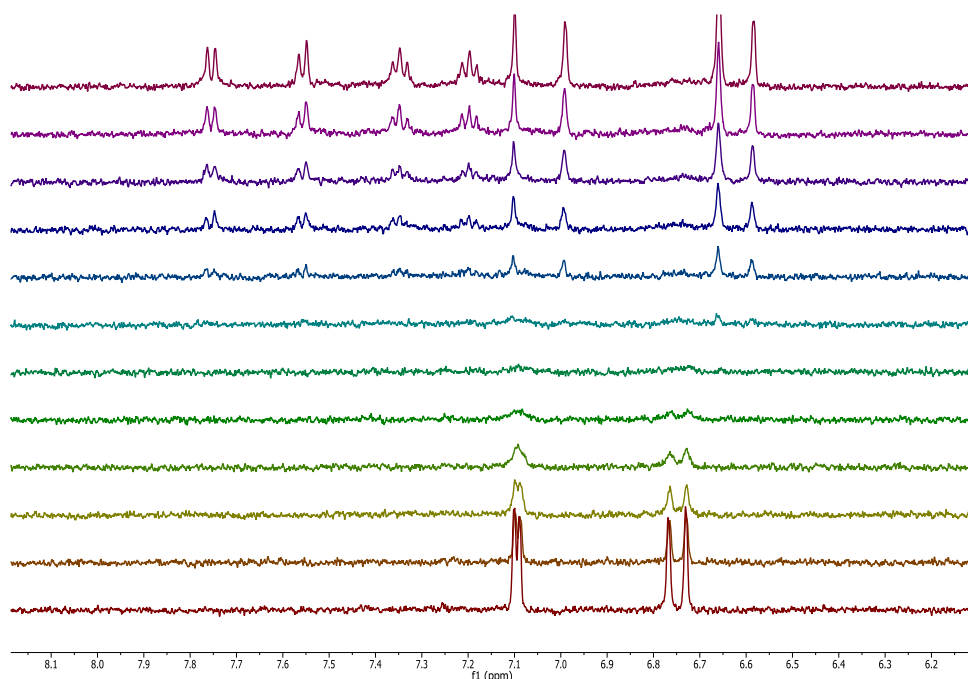


Figura 4.30 Experimento de competición entre la glico-oligoamida catiónica 4 derivada de L-manosa y la netropsina con poly(dA-dT)₂. Espectro en D₂O, tampón fosfato 10 mM, pH=7.3 a 25 °C

En primer lugar se registra un espectro ¹H-RMN de la glico-oligoamida catiónica en el estado libre (espectro granate), para a continuación, añadir cantidades crecientes de Poly(dA-dT)₂ hasta formar el complejo (espectro verde). Este proceso se sigue por la desaparición gradual de las resonancias del compuesto. Una vez formado el complejo, se comienzan a adicionar cantidades crecientes de netropsina. Este ligando es capaz de desplazar a la glico-oligoamida catiónica de su sitio de unión al ADN. Por lo tanto al quedar la glico-oligoamida catiónica libre en disolución, sus señales de resonancia vuelven a aparecer en el espectro (espectro azul). Con la segunda adición de netropsina, aparecen también en el espectro las señales de resonancia del exceso de netropsina libre en disolución (espectro morado).

La situación es análoga para ambas glico-oligoamidas catiónicas, β -D-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (3) y β -L-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (4), las dos compiten con la netropsina por el sitio de unión al Poly(dA-dT)₂. Esto sugiere de una manera indirecta que los dos compuestos podrían ser ligandos del surco menor del ADN.

Por último, con el fin de intentar cuantificar de manera indirecta la unión de las glico-oligoamidas catiónicas al ADN por RMN, se realizó un experimento de competición inverso al descrito previamente. Es decir, en primer lugar se forma el complejo netropsina/Poly(dA-dT)₂ y después se intenta desplazar la netropsina con la glico-oligoamida catiónica derivada de L-manosa 4.



Desafortunadamente, como se ve en la figura, no fue posible desplazar a la netropsina del surco menor y lograr que sus señales volvieran a aparecer, lo cual significa que la netropsina tiene una constante de afinidad mucho mayor que el derivado 4.

4.3.2 Caracterización de la conformación y disposición de β -D-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (3) y β -L-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (4) en el estado asociado con Poly(dA-dT)₂ y Poly(dG-dC)₂

El estudio detallado de la estructura tridimensional de los complejos de las glico-oligoamidas catiónicas con los polímeros de ADN, puede conducir a un mayor entendimiento a nivel molecular de los requerimientos estructurales que regulan el reconocimiento carbohidrato-ADN. La conformación adoptada por las diferentes glico-oligoamidas catiónicas en el estado asociado, la disposición del carbohidrato dentro del surco menor y la orientación del fragmento γ , puede tener implicaciones tanto a nivel estructural como a nivel de afinidad del ligando.

La introducción de los carbohidratos D-manosa y L-manosa en las glico-oligoamidas catiónicas tiene como finalidad el estudio de redes cooperativas de enlace de hidrógeno y su posible influencia en el reconocimiento molecular con ADN. Como ya se ha demostrado en el estado libre, el protón amídico NH5 genera un enlace de hidrógeno unidireccional con el OH2 en posición axial de la manosa en el estado libre en disolución acuosa. Gracias al carácter dual dador/aceptor de enlace de hidrógeno de los hidroxilos, el OH2 a su vez, puede comportarse como dador cooperativo de enlace de hidrógeno en un proceso intermolecular con el ADN. En principio, para que se pueda dar ese proceso cooperativo, el OH2 debería situarse en una región cercana al interior del surco menor. Por este motivo es crucial el estudio detallado de la orientación de los centros del carbohidrato en los complejos de las glico-oligoamidas catiónicas con los distintos polímeros de ADN.

El estudio estructural de los complejos se ha llevado a cabo mediante la combinación de dos técnicas de RMN basadas en la observación del ligando: DF-STD y tr-NOESY.

4.3.2.1 Conformación en el estado asociado: experimentos tr-NOESY

Para poder obtener información de la conformación mayoritaria adoptada por los ligandos en el estado asociado, se realizaron diversos experimentos tr-NOESY de los complejos de las glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4**, con los dos polímeros de ADN (poly(dA-dT)₂ y poly(dG-dC)₂). Dichos experimentos se llevaron a cabo en D₂O a 25 °C y también en H₂O a 5 °C para poder detectar los protones amídicos. El tiempo de mezcla, es decir, el tiempo empleado para transferir la magnetización, se optimizó con objeto de evitar un posible proceso de difusión de spin. Por ello, se realizaron varios experimentos a distintos tiempos de mezcla (desde 50 a 400 ms). Finalmente, los mejores resultados se obtuvieron empleando un tiempo de 200 ms. Todos los espectros correspondientes a los tr-NOESY de los distintos complejos se recogen en el anexo del capítulo.

En la Figura 4.31 se muestra un resumen de los nOes más significativos encontrados en los complejos de las glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4** con Poly(dA-dT)₂. En primer lugar, para todos los complejos en las distintas condiciones de temperatura, se observaron nOes inter-hebra pirrol/pirrol (Py-5^A/Me^B y Py-5^B/Me^A) indicativos de la existencia de una conformación plegada en forma de horquilla. Para el caso concreto del complejo de la glico-oligoamida catiónica derivada de L-manosa **4** en D₂O a 25 °C, además se detectaron nOes inter-hebra entre protones de la cara α del carbohidrato y el indol (H1/Ind3, H2/Ind3, H2/Ind4). Sin embargo en esas mismas condiciones, en el complejo con el derivado de D-manosa **3**, no se apreciaron nOes carbohidrato/indol. Al realizar los experimentos a una temperatura menor, 5 °C, en H₂O, sí fue posible detectar nOes entre la cara α del carbohidrato y el indol, en los dos complejos. Probablemente, esto es debido a la estabilización de la conformación plegada en el estado asociado por efecto del descenso de la temperatura. En ambos casos, al igual que en la conformación mayoritaria en el estado libre de las dos moléculas, existe una selección de la cara α del carbohidrato hacia el indol.

Gracias a los tr-NOESY en H₂O, fue posible detectar las señales de resonancia correspondientes a los protones intercambiables de las amidas. Se han obtenido nOes intra-hebra determinantes a la hora de establecer la conformación arqueada característica de este tipo de moléculas (Py-3^A/NH3, Py-3^B/NH5). Al igual que en la conformación en el estado libre, se han podido definir los dos arcos: el arco interior delimitado por los grupos NH presentes en la estructura y el arco exterior, delimitado por los grupos Me de los pirroles. Cabe destacar, que en el caso del complejo del derivado de L-manosa con Poly(dA-dT)₂ se han detectado nOes adicionales entre Ind-3/NH2 y Ind-7/NH1.

Estos experimentos en H₂O también han permitido deducir la conformación del enlace amido-glicosídico en el estado asociado. La detección del nOe Py-3^B/NH5 en los dos complejos, tanto con el derivado de D-manosa como en el derivado de L-manosa, indica que la configuración de ese enlace es *Z*. Asimismo, se observaron nOes intensos H2/NH5 en ambos complejos correspondientes a una conformación mayoritaria *anti*.

Además, gracias a los nOes inter-hebra carbohidrato/indol, también ha sido posible deducir que el plegamiento mayoritario de ambas glico-oligoamidas catiónicas (**3** y **4**) en el estado asociado con Poly(dA-dT)₂ es de tipo **B**, es decir, que los centros C2 y C3 del carbohidrato se orientan hacia el interior del arco NH. Se observaron nOes entre H1 y H2 del carbohidrato con Ind-3, también H2/Ind-4, y además, nOes entre H3 del carbohidrato con los protones del anillo de seis miembros del indol. Esto sugiere que el H3 del carbohidrato podría orientarse hacia el centro del anillo de seis miembros del indol, quedando H5 más alejado del mismo. De nuevo, al tener dos derivados distintos con carbohidratos enantiómeros cada uno, el resultado de la estructura tridimensional final para los mismos datos experimentales es el opuesto.

En general, la conformación encontrada en los complejos es análoga a la encontrada para la conformación mayoritaria encontrada en el estado libre. Esta similitud cobra importancia ante la dificultad de lograr la misma información estructural para el estado asociado, que para las conformaciones en el estado libre. En el estado enlazado, no se han podido detectar las señales de todos los protones intercambiables, solamente de algunos NH. Por este motivo no se puede tener una confirmación a nivel experimental de la presencia del enlace de hidrógeno intramolecular NH5...OH2. Sin embargo, dado que muchas de las características de la conformación en el estado libre, están también presentes en el estado asociado, se podría aventurar que posiblemente el enlace de hidrógeno intramolecular persista también en el estado asociado NH5...OH2.

Por último, en cuanto a la conformación adoptada por el propio carbohidrato, en todos los experimentos se han observado nOes entre H1/H3, H1/H5 y H3/H5 indicativos de una conformación del anillo de piranosa de tipo ⁴C₁ para β-D-Man-Py-γ[(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) y de tipo ¹C₄ para β-L-Man-Py-γ[(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**).

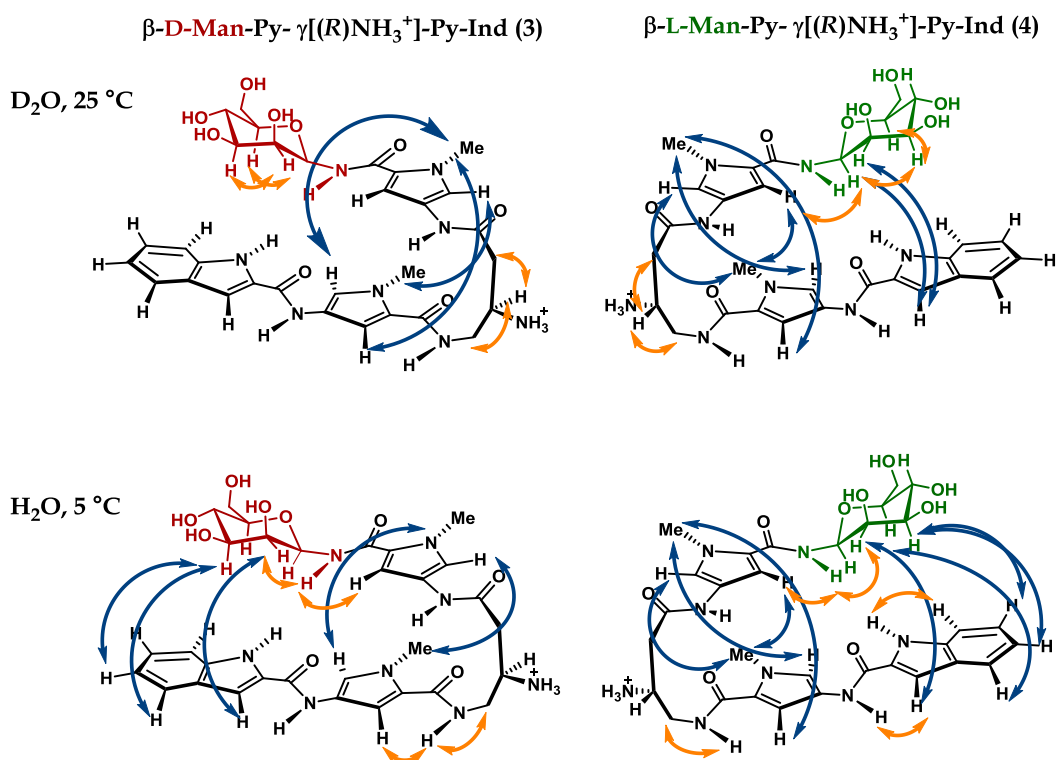


Figura 4.31 Esquema de los nOes intra-hebra (naranja) e inter-hebra (azul) encontrados para los complejos de β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) y β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) con Poly(dA-dT)₂.

En los experimentos tr-NOESY de los complejos de ambas glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4** con Poly(dG-dC)₂, se han obtenido resultados similares. En la Figura 4.32 se muestran los nOes más significativos encontrados en las distintas condiciones, que sugieren la existencia de una conformación mayoritaria en el estado asociado con Poly(dG-dC)₂ igual a la encontrada en los complejos con Poly(dA-dT)₂. De nuevo, en ambos complejos en D₂O a 25 °C, se detectan nOes Py-5^A/Me^B y Py-5^B/Me^A correspondientes a una conformación plegada en forma de horquilla. Al igual que sucede en el caso de los complejos con Poly(dA-dT)₂, cabe destacar que en el complejo del derivado de L-manosa **4**, se encuentran nOes inter-hebra carbohidrato/indol en esas condiciones, mientras que en el complejo con D-manosa **3** no se detectan. Sin embargo, en los tr-NOESY en H₂O a 5 °C, sí se observan nOes carbohidrato/indol en los dos complejos. Por lo tanto, estos datos estructurales apuntan a una mejor definición de la conformación en forma de horquilla de la glico-oligoamida catiónica de L-manosa **4** en el estado asociado, tanto para el complejo con Poly(dA-dT)₂ como con Poly(dG-dC)₂.

Los nOes inter-hebra carbohidrato/indol detectados en los dos complejos con Poly(dG-dC)₂ indican una selección de la cara α del carbohidrato sobre el indol. Se observa una cercanía espacial entre los protones H1, H2 y H3 del carbohidrato y el indol. Además, los nOes de los protones H1 y H2 con Ind-3, en conjunto con los nOes de H3 con los protones que forman parte del anillo de seis miembros del indol (Ind-4, Ind-5, Ind-6 e Ind-7) indican un plegamiento de tipo **B** en la conformación predominante del estado asociado, en ambos complejos con Poly(dG-dC)₂.

En los experimentos tr-NOESY de estos complejos en H₂O, también se detectan señales de los protones intercambiables de las amidas y sus correspondientes picos de cruce nOe, que han permitido probar la existencia de la conformación arqueada adoptada por las glico-oligoamidas catiónicas en disolución acuosa. Al igual que en los complejos con Poly(dA-dT)₂, gracias a la observación de los nOes Py-3^B/NH5 y H2/NH5, ha sido posible determinar que la conformación del enlace amido-glicosídico de los derivados catiónicos en el estado asociado es *Z anti*.

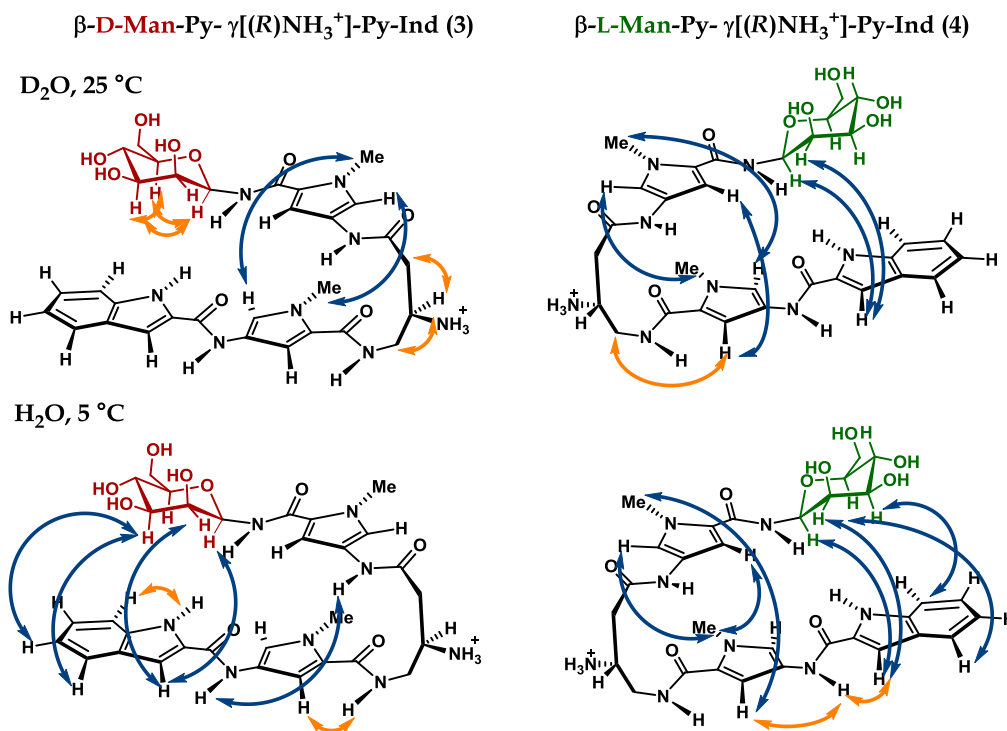


Figura 4.32 Esquema de los nOes intra-hebra (naranja) e inter-hebra (azul) encontrados para los complejos de β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) y β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) con Poly(dG-dC)₂.

En todos los complejos se ha detectado una conformación plegada en forma de horquilla análoga a la encontrada en el estado libre. Por tanto, se puede concluir que las interacciones que rigen el plegamiento de las glico-oligoamidas catiónicas en el estado libre, persisten en el estado asociado al ADN. Esto permite proponer la existencia del enlace de hidrógeno intramolecular NH5...OH2, también en el estado asociado, a pesar de que no haya evidencias directas de ello. La macromolécula no induce un cambio de conformación en los derivados de D y L-manosa. La orientación del carbohidrato sobre el indol también se mantiene, siendo la cara α del carbohidrato la seleccionada por el indol. De esta forma, se pone de manifiesto la relevancia de las interacciones CH- π , que pueden ser el origen de esta selección de cara.

La principal diferencia encontrada entre los complejos de ambas glico-oligoamidas catiónicas 3 y 4, es que para los mismos resultados experimentales, las estructuras tridimensionales de cada una son opuestas. Al contener carbohidratos que son enantiómeros entre sí, el sentido del plegamiento en cada una es diferente y por tanto

el grupo amino del fragmento γ se sitúa de forma diferente en cada caso. Esto influirá en la colocación de estas en el surco menor del ADN.

Por último, cabe destacar que hay una mejor definición de la horquilla en los dos complejos de β -L-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (**4**) tanto con secuencias AT como GC. En principio, no se han obtenido diferencias estructurales por RMN que justifiquen este hecho. Sin embargo, si se relaciona esto con resultados obtenidos de los modelos teóricos de los ligandos en el estado libre, la posible existencia del enlace de hidrógeno entre el carbonilo de la amida y el NH_3^+ del fragmento γ , en el plegamiento **B** de la glico-oligoamida de L-manosa, se puede sugerir que la existencia de dicho enlace de hidrógeno extra contribuye en la mejor definición de la horquilla.

4.3.2.2 Experimentos Differential-Frequency Saturation Transfer Difference (DF-STD)

Para obtener información de la orientación de las glico-oligoamidas catiónicas dentro del surco menor del ADN, se llevaron a cabo experimentos DF-STD de los complejos de ambas glico-oligoamidas catiónicas con poly(dA-dT)₂ y poly(dG-dC)₂. Se empleó la misma metodología usada en el capítulo anterior. Se realizaron dos juegos diferentes de experimentos STD irradiando en dos frecuencias correspondientes a protones de la desoxirribosa del ADN que se encuentran en la zona exterior ($\delta = 4.5$ ppm, H4', H5' y H5'') e interior ($\delta = 5.6$ ppm, H1') del surco menor respectivamente. Afortunadamente, ninguna de las señales correspondientes a los ligandos se encuentra en esa región del espectro. No obstante, para confirmar que las resonancias de los ligandos no se veían afectadas por las irradiaciones selectivas a 4.5 y 5.6 ppm, se realizaron experimentos STD control de las glico-oligoamidas catiónicas en ausencia de ADN.²¹ De esta forma, se ha podido evaluar la diferencia de transferencia de saturación a los ligandos en función de la zona del ADN irradiada.

En primer lugar, se llevaron a cabo los experimentos de los complejos de ambas glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4** con Poly(dA-dT)₂ en D₂O tampón fosfato a 25 °C. En ambos casos se empleó la misma relación molar ligando/ADN (1/0.05), con una concentración de 180 μ M para el derivado de D-manosa y de 220 μ M para el derivado de L-manosa. Cabe destacar la observación de señal STD en todos los casos, lo cual es indicativo de la unión y formación del complejo de ambas glico-oligoamidas catiónicas con el polímero de ADN. También es importante recalcar que hay transferencia de saturación a toda la molécula, incluyendo la región del carbohidrato. Esto indica que toda la molécula se encuentra dentro del surco menor del ADN, inclusive el carbohidrato. Como se muestra en la Figura 4.33, se observan distintos grados de saturación para los distintos protones de las dos glico-oligoamidas catiónicas. El patrón de transferencia de saturación es similar para ambas glico-oligoamidas catiónicas en ambas irradiaciones. El mayor grado de saturación se obtiene para los residuos aromáticos, Ind-3 y Py-3^A. No obstante, algunos protones del carbohidrato también reciben un porcentaje elevado de STD, por encima del 50%. Por lo tanto, la primera conclusión de los experimentos DF-STD es que los derivados **3** y **4** se unen al surco

²¹ Los experimentos control de los DF-STD se pueden ver en el anexo del capítulo.

menor del Poly(dA-dT)₂, quedando próximos a ambas regiones de la macromolécula (H1', interior y H4', H5' y H5'', exterior).

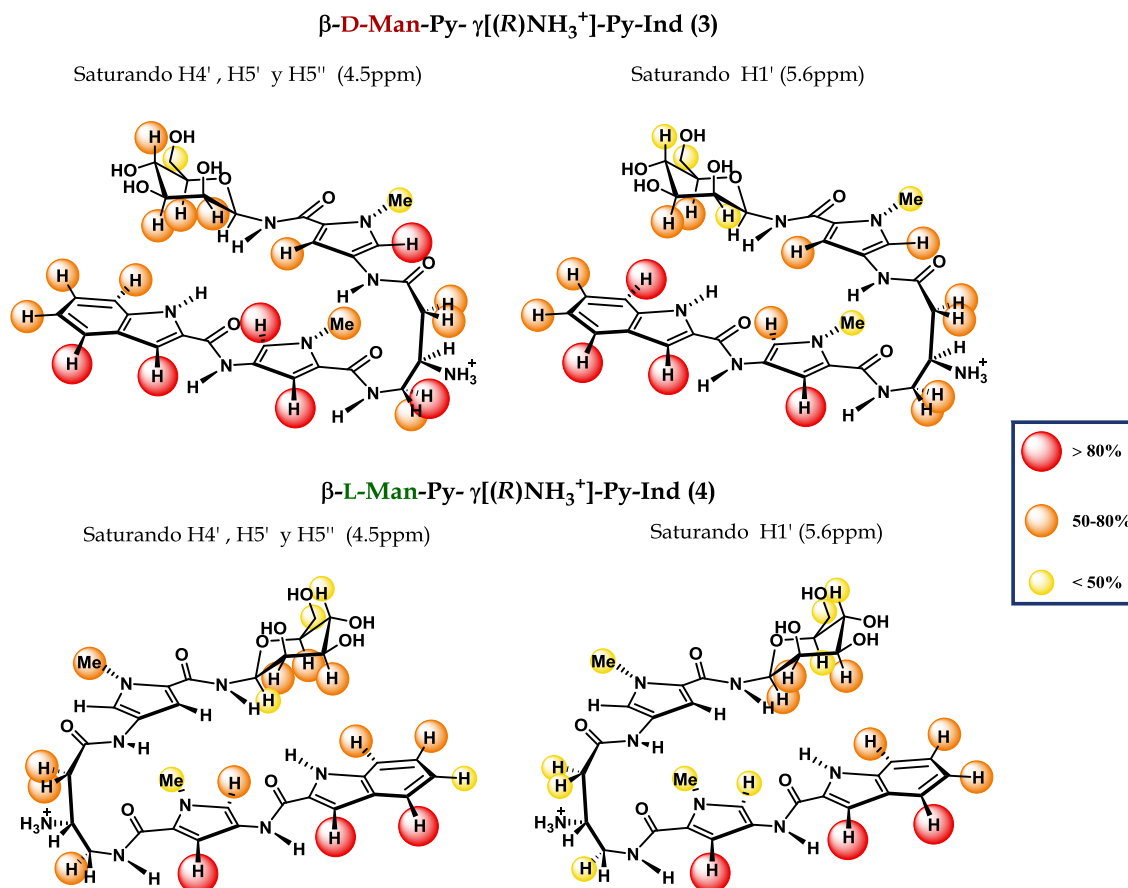


Figura 4.33 Epítomos obtenidos de los datos STD del complejo de β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) con Poly(dA-dT)₂ y del complejo de β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) con Poly(dA-dT)₂. El código de colores representa las intensidades STD de cada protón relativas a la intensidad STD de la señal más saturada. Rojo, por encima del 80 %; naranja, entre un 50 y un 80 % y amarillo por debajo del 50%. Los protones sin código de color no se pudieron evaluar debido al solapamiento de señales.

Para poder describir la orientación de la molécula dentro del surco menor del polímero de ADN, se calculó el cociente de intensidades STD (I_f/I_d). El criterio establecido para definir la orientación de los distintos protones y llevar a cabo conclusiones estructurales, fue que la diferencia en porcentaje entre las dos regiones del ADN irradiadas debía ser de al menos de un 10 %. Los valores calculados para cada protón de ambas glico-oligoamidas catiónicas se encuentran en el anexo del capítulo. La evaluación de estos datos permite describir el epítipo del ligando próximo a la región interna o externa del surco menor, al mismo tiempo que indica su unión al ADN.

En el esquema de la Figura 4.34 se muestra en azul, las resonancias de los ligandos que vieron más perturbada su intensidad al irradiar la región espectral correspondiente a los protones H4', H5' y H5'' de desoxirribosa, zona exterior del surco menor ($I_f/I_d \geq 1.1$). Por otro lado, se muestran en rojo, las resonancias del ligando que se ven más afectadas al efectuar la irradiación sobre H1', es decir, las cercanas a la región interna del surco menor del ADN ($I_f/I_d \leq 1.0$).

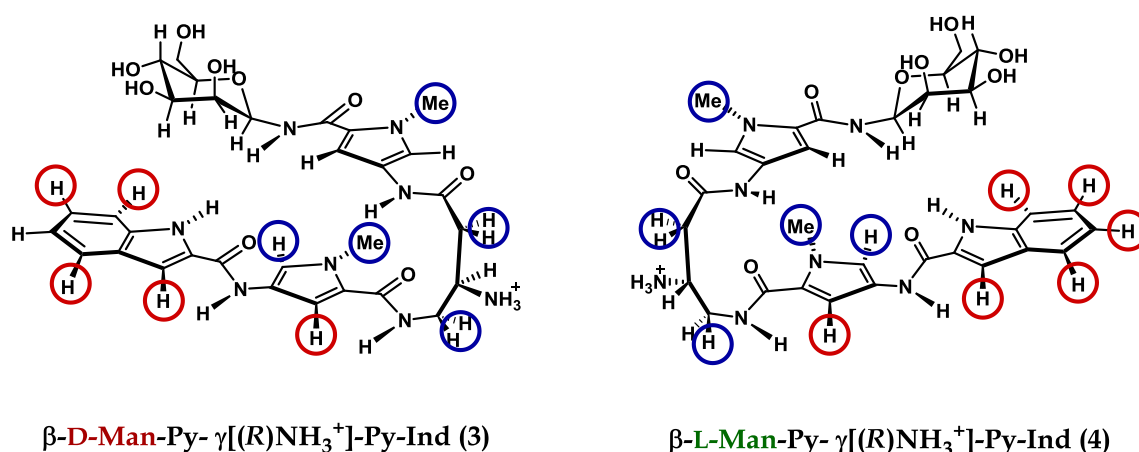


Figura 4.34 Resultados de los experimentos DF-STD de los complejos de β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) y β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) con Poly(dA-dT)₂

Los resultados sugieren un modo de unión general para ambos ligandos, en el cual la zona del arco NH quedaría orientada hacia la región interna de surco menor del Poly(dA-dT)₂. El arco NMe quedaría situado hacia la región externa del surco, tal y como indica la mayor perturbación sufrida por las señales de los protones Me^A, Me^B y Py-5^A al irradiar a 4.5 ppm. Esta curvatura de la molécula y modo de unión, es análogo al encontrado tanto para las glico-oligoamidas neutras y miméticos de factores de transcripción estudiados en nuestro grupo, como para las oligoamidas heteroaromáticas de Dervan.

Analizando de una manera global los valores DF-STD de los dos derivados, en ambos el fragmento γ , parece situarse en una región más externa del surco, probablemente para minimizar el impedimento estérico con las paredes y suelo del surco menor. En cuanto al indol, los valores I_f/I_d por debajo de 1, lo ubican próximo a la región interna del surco. Al margen de este comportamiento general de las dos moléculas, se encuentran variaciones en la región del carbohidrato de ambos ligandos. En el derivado de D-manosa **3**, el carbohidrato muestra valores de I_f/I_d por encima de 1.1, indicando su proximidad a la zona externa del surco. Por el contrario, en el derivado de L-manosa hay varios protones con valores por debajo de 1.1, situándolos en una región más interna del surco menor (Figura 4.35).

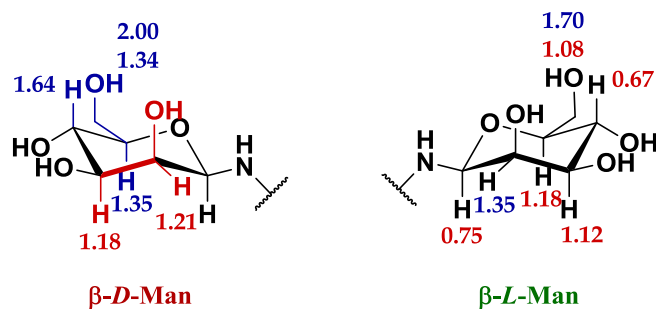


Figura 4.35 Resultados de los experimentos DF-STD del fragmento del carbohidrato de los complejos de β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) y β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) con Poly(dA-dT)₂

Si se realiza un análisis de los valores I_f/I_d , teniendo en cuenta solamente la región del carbohidrato, para el caso de la glico-oligoamida catiónica de D-manosa **3**, se observa que los centros C2 y C3, poseen valores menores de I_f/I_d , pudiendo indicar una mayor cercanía de estos centros a la zona interna del surco menor del Poly(dA-dT)₂. Por lo tanto, el OH2, que puede actuar como centro dador cooperativo de enlace de hidrógeno, se situaría orientado a la región interna. A diferencia de los valores obtenidos para D-manosa, en el caso del derivado de L-manosa **4**, se observa una mayor heterogeneidad en los valores I_f/I_d , no siendo posible predecir una orientación determinada. Sin embargo, cabe destacar en este derivado, la detección de valores de I_f/I_d inferiores a 1.1, sugiriendo una mayor cercanía de la L-manosa al surco menor, que en el caso de su análogo que contiene D-manosa.

También se realizaron experimentos de los complejos de ambas glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4** con Poly(dG-dC)₂ en D₂O tampón fosfato a 25 °C. En ambos casos se empleó la misma relación molar ligando/ADN (1/0.1). De nuevo, para los dos derivados, en los dos tipos de irradiación se observa transferencia de saturación a toda la molécula incluyendo el carbohidrato (Figura 4.36). Por lo tanto, ambos ligando también se unen y forman complejos con el surco menor de secuencias GC. En general, los residuos aromáticos reciben más transferencia de saturación que el resto de fragmentos de la molécula, especialmente el indol. En el caso del derivado **3**, las resonancias del carbohidrato se vieron más afectadas por la irradiación realizada a 4.5 ppm, zona externa del surco menor. Sin embargo en el caso del derivado **4** de L-manosa, la transferencia de saturación al carbohidrato fue similar en ambas irradiaciones.

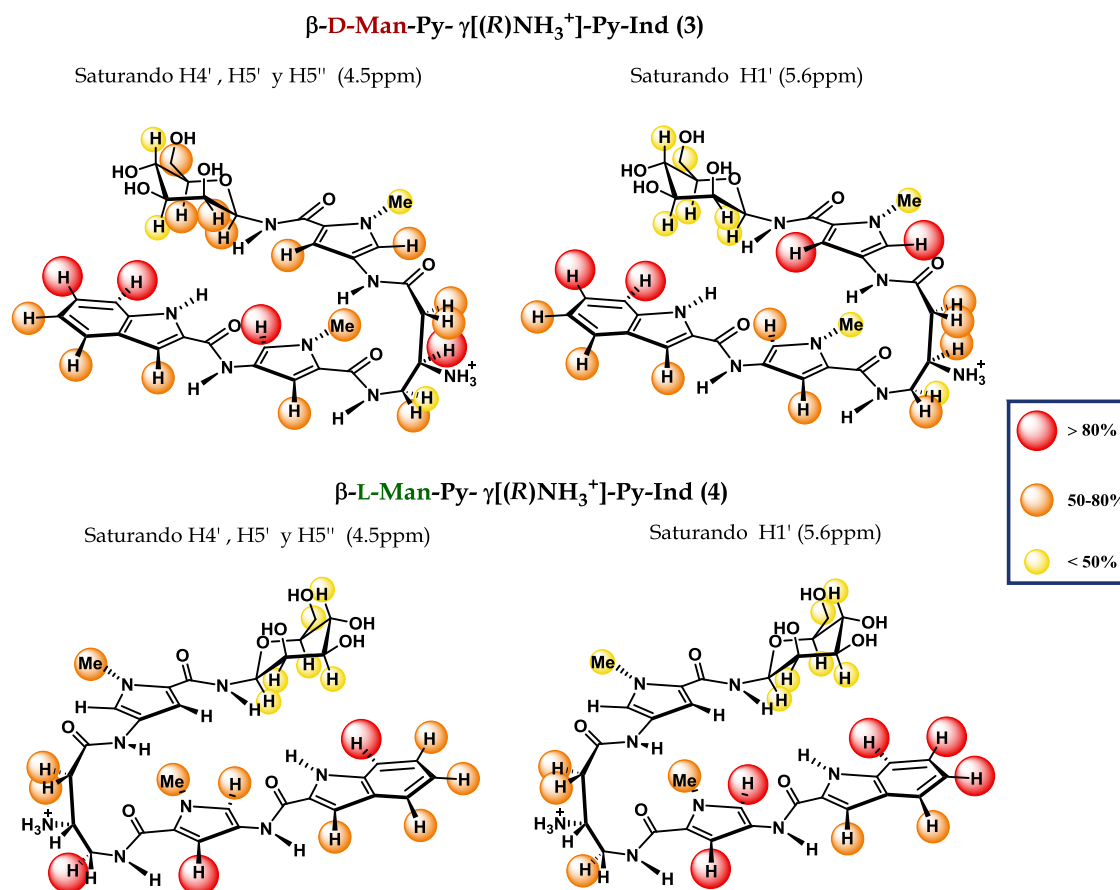


Figura 4.36 Epítomos obtenidos de los datos STD del complejo de β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) con Poly(dG-dC)₂ y del complejo de β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) con Poly(dG-dC)₂. El código de colores representa las intensidades STD de cada protón relativas a la intensidad STD de la señal más saturada. Rojo, por encima del 80 %; naranja, entre un 50 y un 80 % y amarillo por debajo del 50%.

El cálculo del cociente de intensidades STD (I_f/I_d) del complejo con Poly(dG-dC)₂ permite describir una situación análoga a la obtenida en los complejos con Poly(dA-dT)₂, donde el arco NMe queda orientado hacia la región externa del surco menor, mientras que el arco NH se sitúa en la zona interna (Figura 4.37). Se observan valores por encima de 1.1 para los protones Me^A, Me^B y Py-5^A. Al mismo tiempo, los valores para Py-3^A y Py-3^B están por debajo de 1.1. Al igual que antes, en ambos complejos el indol presenta valores I_f/I_d por debajo de 1, indicando su cercanía al interior del surco.

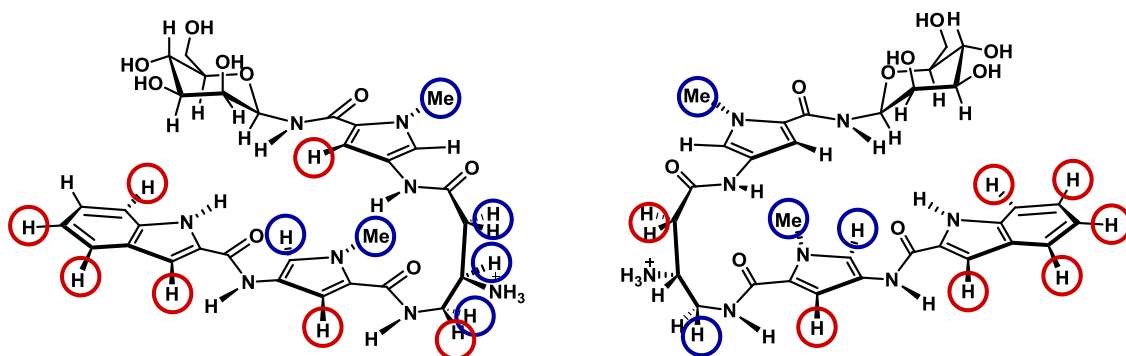


Figura 4.37 Resultados de los experimentos DF-STD de los complejos de β -D-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (3) y β -L-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (4) con Poly(dG-dC)₂

Respecto al carbohidrato, el análisis aislado de los valores I_f/I_d de D-manosa y L-manosa se muestra en la Figura 4.38. En el complejo de la glico-oligoamida catiónica de D-manosa **3**, se observa la tendencia inversa a la obtenida en el complejo con Poly(dA-dT)₂. Es decir, los valores I_f/I_d de menor magnitud, y por tanto los centros orientados hacia la región interna del surco son C5 y C6, situándose el posible centro dador cooperativo de enlace de hidrógeno hacia el exterior del surco. La situación del carbohidrato en el complejo de la glico-oligoamida catiónica derivada de L-manosa es diferente. Los valores I_f/I_d para los centros C5 y C6 sugieren una proximidad a la región externa del surco menor del Poly(dG-dC)₂. Por lo tanto, los centros C2 y C3 se situarían en una región próxima a la región interna del surco, facilitando la posible participación del OH2 en un proceso de interacción cooperativo intermolecular con el ADN. Esto podría contribuir a la diferencia de afinidad observada entre los derivados de D-manosa y L-manosa con poly(dG-dC)₂.

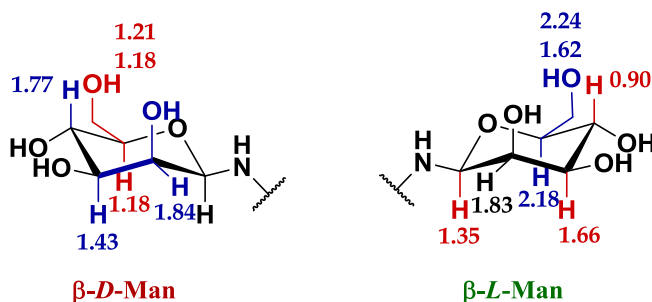


Figura 4.38 Resultados de los experimentos DF-STD del fragmento del carbohidrato de los complejos de β -D-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (3) y β -L-Man-Py- $\gamma[(R)NH_3^+]$ -Py-Ind (4) con Poly(dG-dC)₂

Si se comparan estos resultados con los obtenidos previamente en nuestro grupo de investigación se encuentran analogías. En el caso de las glico-oligoamidas neutras derivadas de D-manosa y L-manosa también se encontraron diferencias en cuanto a afinidad y orientación del residuo sacarídico en los diferentes complejos con polímeros de ADN, Poly(dA-dT)₂ y ct-ADN. En el complejo del derivado neutro de L-man con poly(dA-dT)₂, el OH2 se sitúa dentro del surco menor y la cara α del carbohidrato se orienta hacia el indol. En el caso del derivado neutro de D-man el OH2 queda hacia fuera del surco menor y no se define la cara del azúcar que está hacia el indol.

Con estos derivados neutros no fue posible acceder a secuencias compuestas exclusivamente por pares de bases GC, por lo que los datos estructurales obtenidos con las glico-oligoamidas catiónicas tienen un valor añadido. No obstante, sí se obtuvieron resultados de los complejos con ct-ADN. En el complejo con el derivado de L-manosa se observa una selección de la cara α del carbohidrato hacia el indol. Además el OH2 (centros C2 y C3) del carbohidrato se orienta hacia la región interna del surco menor. Sin embargo, en el caso del complejo con el derivado de D-manosa, no se pueden definir ni la cara cercana al indol, ni los centros próximos al interior del surco menor.

En el caso de las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa y L-manosa, se ha podido determinar qué centros están próximos al surco menor en complejos con Poly(dA-dT)₂ y con Poly(dG-dC)₂, encontrando diferencias en la orientación del carbohidrato en función de la secuencia de pares de bases. Es interesante destacar, que el patrón de comportamiento del carbohidrato sea similar al margen del tipo de glico-oligoamida que lo contenga.

4.4 Experimentos de calorimetría isotérmica de titulación (ITC)

Los parámetros termodinámicos de un proceso de reconocimiento molecular, proporcionan una información esencial que complementa con los estudios estructurales, los cuales, por si solos no aportan datos sobre las fuerzas moleculares que rigen la formación de los complejos. Gracias al desarrollo tecnológico y a la mayor disponibilidad comercial de microcalorímetros de alta sensibilidad, el estudio biofísico de los parámetros termodinámicos de interacciones entre moléculas pequeñas y ADN ha sido objeto de un interés creciente.²² La estructura tridimensional de los complejos con ADN, obtenida mediante RMN y rayos X, se puede situar en un contexto termodinámico, lográndose conocer con más detalle las características energéticas que gobiernan dichos procesos de interacción y formación de complejos. La comprensión y análisis detallado de las distintas contribuciones a la energía libre de estos procesos de unión, está orientado a la realización de un diseño racional de nuevas moléculas, que logren reconocer y codificar secuencias específicas de ADN, al mismo tiempo que se modula su afinidad.²³

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC, del inglés, Isothermal Titration Calorimetry) es una técnica de gran valor a la hora de estudiar procesos de interacción macromolécula-ligando, ya que es la única técnica capaz de medir directamente la entalpía de unión de procesos de interacción en disolución.²⁴ En esta técnica se mide directamente el calor absorbido o liberado durante un proceso de interacción, permitiendo determinar la afinidad del ligando por la macromolécula correspondiente (K), la estequiometría (n), la entalpía del proceso (ΔH), y como consecuencia, la energía libre estándar (ΔG°) y la entropía (ΔS). Además, si se realizan experimentos a diferentes

²² (a) Haq, I. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, 403, 1–15. (b) Lane, A.N.; Jenkins, T.C. *Q. Rev. Biophys.* **2000**, 33, 255–306. (c) Chaires, J. B. *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, 37, 135–51

²³ Ladbury, J. E. *Thermochim. Acta* **2001**, 380, 209–215.

²⁴ Haq, I.; Jenkins, T. C.; Chowdhry, B. Z.; Ren, J.; Chaires, J. B. In *Methods Enzymol.*; Michael L. Johnson, G. K. A., Ed.; Academic Press: 2000; Vol. Volume 323, p 373.

temperaturas, también se puede determinar la capacidad calorífica del proceso (ΔC_p). Un experimento convencional de ITC, está constituido por una serie de inyecciones de un determinado volumen de disolución del ligando, constante o variable para cada inyección, separadas cada una de ellas por un intervalo de tiempo suficiente para asegurar que se ha alcanzado el equilibrio, y se ha transferido o compensado todo el calor liberado o absorbido (Figura 4.39). Se emplea una celda de referencia, la cual recibe una potencia constante, para medir la potencia que se tiene que aplicar a la celda de la muestra, para lograr mantener la diferencia de temperatura entre ambas celdas igual a cero ($\Delta T=0$). Una vez obtenido el termograma neto y corregida su línea base, se integra el área de sus señales en función del tiempo, para obtener el calor correspondiente de cada inyección de la titulación. Estos cuales se corrigen con los calores de dilución del ligando y se normalizan para la concentración total de ligando en la celda tras cada inyección. Los valores del calor transferido por mol de ligando añadido (dq/dL_T) representados frente a la relación molar ligando/macromolécula ($[L]_T/[M]_T$) permiten obtener la isoterma de unión. Tras el ajuste no lineal de esta curva, se pueden obtener los valores de constante de afinidad (K), la entalpía de unión molar estándar (ΔH) y la estequiometría (n). La estequiometría para el caso particular de experimentos con ADN, se correspondería con el número de pares de bases que ocupa una molécula de ligando, proporcionando así el tamaño del sitio de unión.

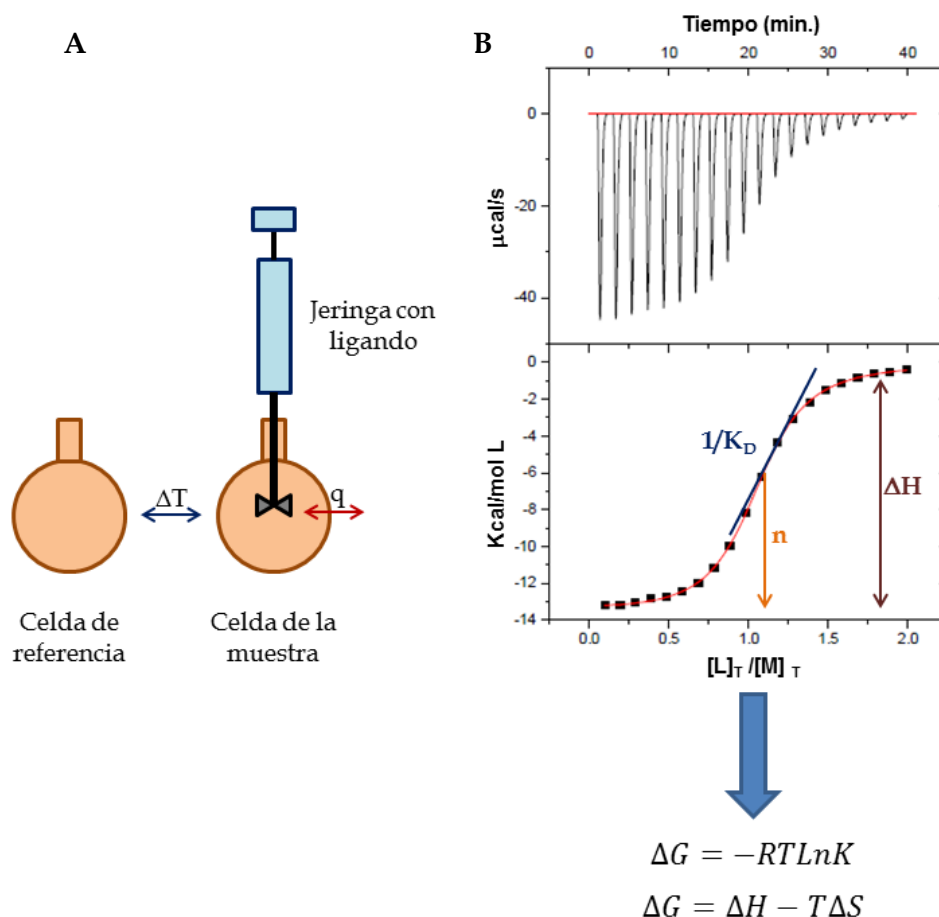


Figura 4.39 A) Representación esquemática de un instrumento de ITC, con una celda de referencia, una celda donde se introduce la macromolécula y una jeringa automática que contiene el ligando. La

diferencia de temperatura entre ambas celdas debida al proceso de unión, se traduce en la potencia necesaria para equilibrar la temperatura de ambas celdas. B) Termograma obtenido de un experimento de ITC y su correspondiente isoterma de unión de la cual se obtienen directamente los valores de K , ΔH y n .

El análisis y ajuste posterior de las isotermas de unión no es trivial. Puede resultar especialmente complicado en los complejos de ADN, debido a que puede haber más de un equilibrio al mismo tiempo. En los experimentos de interacción con ADN, existen múltiples sitios de unión, hay posibles procesos de agregación del ligando, ya que se encuentra a una elevada concentración en la jeringa; procesos de competición o incluso diferentes modos de unión del mismo ligando, por lo tanto, muchas veces se obtienen isotermas de unión que no pueden ser ajustadas a un equilibrio simple.

Los experimentos de ITC se realizaron en colaboración con Dr. Niklaas Buurma de la universidad de Cardiff, el cual ha desarrollado un programa de análisis propio, llamado IC-ITC, para análisis de sistemas complejos.²⁵ Este programa permite el análisis numérico de datos calorimétricos, correspondientes a varios equilibrios que están sucediendo al mismo tiempo, teniendo en cuenta los posibles procesos de auto agregación del ligando y posterior unión al ADN (Figura 4.40). En esencia, este análisis numérico para equilibrios complejos consiste en cinco pasos: en primer lugar calcular las concentraciones de cada especie después de cada inyección, resolver las ecuaciones del balance de masas y calcular las concentraciones de los complejos en disolución, calcular los calores correspondientes a la formación o ruptura de complejos en cada inyección, encontrar los parámetros termodinámicos que mejor reproducen los datos experimentales²⁶ y, por último, determinar los márgenes de error para los parámetros ajustados.

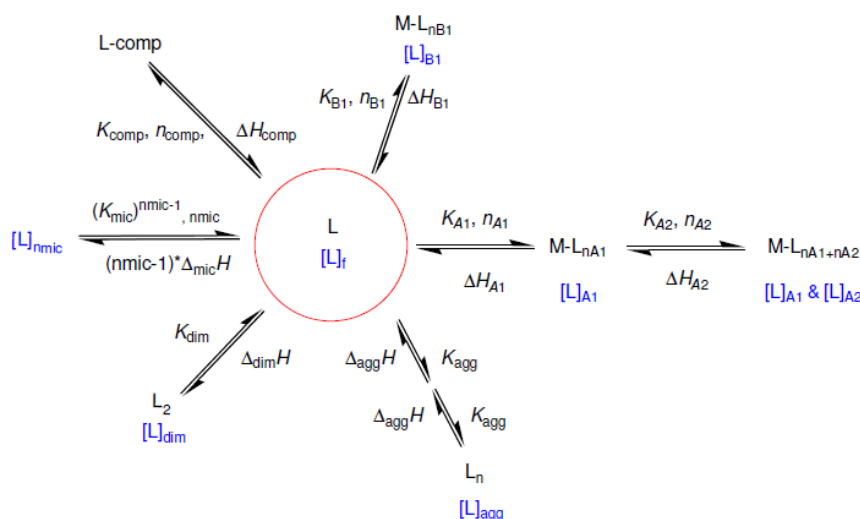


Figura 4.40 Posibles equilibrios implicados en un experimento de ITC: diferentes equilibrios de auto agregación y procesos de unión al ADN.²⁵

²⁵ (a) Buurma, N. J.; Haq, I. J. *Mol. Biol.* **2008**, 381, 607-621.(b) Buurma, N. J.; Haq, I. *Methods* **2007**, 42, 162-172

²⁶ Kirkpatrick, S.; Gelatt, C. D.; Vecchi, M. P., *Science* **1983**, 220, 671-680.

El objetivo de realizar experimentos de unión mediante ITC con las glico-oligoamidas catiónicas era poner a punto una metodología para poder cuantificar y obtener un perfil termodinámico de la interacción con los polímeros de ADN. Al poder cuantificar la interacción, también se podría obtener información sobre el posible proceso cooperativo de enlace de hidrógeno intermolecular, entre los centros cooperativos del carbohidrato y el ADN, por comparación entre las distintas glico-oligoamidas catiónicas, la que contienen centros dadores cooperativos de enlace de hidrógeno en el residuo sacarídico y las que no los poseen.

En principio, se planteó poner a punto el experimento empleando la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2**. Generalmente, cuando se plantea el experimento de ITC, en primer lugar se debe obtener el termograma de dilución del ligando en el tampón que se va a emplear en la posterior titulación con el DNA. Este representa los calores de dilución del ligando en el tampón y puede proporcionar también información sobre posibles procesos de auto asociación del propio ligando. Cuando se realizó este experimento de dilución con la glico-oligoamida catiónica derivada de xilosa con parámetros estándar, se observó un calor residual después de cada inyección que impedía la recuperación de la línea base en el termograma por lo que se tuvo que ampliar el tiempo transcurrido entre inyecciones de 300 s a 600 s (Figura 4.41 A). Se decidió realizar una primera titulación con Fish Sperm ADN (FS-ADN) para comprobar si se observaba el mismo efecto. En esta ocasión se dejó un tiempo inicial de 600 s entre inyecciones, pero de nuevo se tuvo que ampliar este margen, dejando un intervalo de hasta una hora para poder recuperar el nivel de la línea base (Figura 4.41 B).

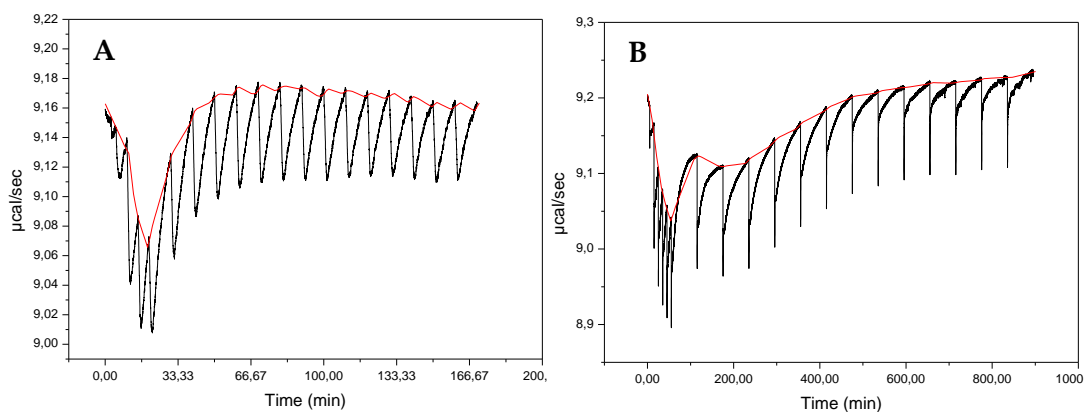


Figura 4.41 A) Termograma obtenido de la dilución de la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2** (700 μM) en tampón fosfato. B) Termograma obtenido de la titulación de glico-oligoamida catiónica de xilosa **2** (700 μM) en FS-ADN (150 μM p.b.)

Se repitieron estos experimentos en varias ocasiones con distintas disoluciones de ligando recién preparadas, a diferentes concentraciones, para comprobar la reproducibilidad del experimento, obteniéndose resultados similares en todos los casos. Por lo general, este tipo de distorsión en las señales, es decir señales anchas, se corresponde con un proceso lento en disolución. Normalmente, son procesos lentos, la disolución de partículas sólidas presentes en la disolución, o la precipitación de los

complejos o alguno de los componentes de la muestra. Sin embargo, en nuestro caso no se observó precipitado alguno en la disolución extraída de la celda, y todas las muestras empleadas se filtran previamente. Otra posibilidad era la posible presencia de procesos de auto-asociación, en donde el equilibrio de formación y ruptura de agregados es lento. Partiendo de esta hipótesis, y asumiendo que ese proceso de liberación de calor lento era debido a un proceso de ruptura de agregados supramoleculares, se decidió emplear un 7% de DMSO como codisolvente, con objeto de impedir la formación de estos agregados. Desafortunadamente, los resultados obtenidos fueron similares. La falta de definición de las señales, impide realizar un buen ajuste de la línea base y se puede cometer mucho error al realizar las integraciones del área de cada inyección (Figura 4.42).

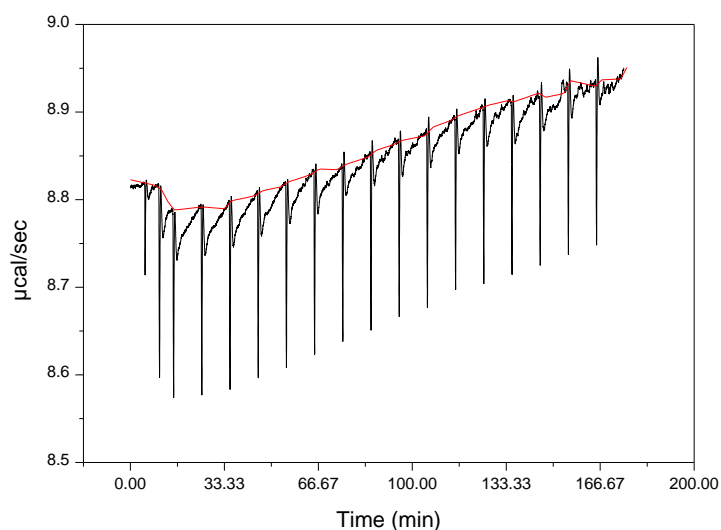


Figura 4.42 Termograma obtenido de la dilución de glico-oligoamida catiónica de xilosa 2 (350 μM) en tampón fosfato con 7% de DMSO.

Como se verá en el siguiente capítulo, en la bibliografía, se encuentran algunas alusiones a procesos de agregación en disolución acuosa sufridos por ligandos del ADN. No obstante, a menudo, los detalles de estos procesos de agregación no son descritos. Si la agregación de los ligandos interfiere o no, en los experimentos de interacción con el ADN, depende de la técnica empleada en los estudios y de cómo sea el equilibrio del proceso de formación y ruptura del agregado. Muchas de las técnicas que se emplean en el estudio de las interacciones con ADN, requieren bajas concentraciones de ligando, en las cuales, este solo existe como monómero. Es el caso de las técnicas espectroscópicas, como por ejemplo la espectroscopia ultravioleta-visible, el dicroísmo circular o la fluorescencia. En estos experimentos, por lo general, la agregación es a menudo despreciable y por ello no interfiere en la interpretación de los estudios de interacción con el ADN.

Desafortunadamente, en el caso del ITC, el ligando se encuentra a elevada concentración en la jeringa de inyección, propiciando la existencia de agregados. Por lo tanto, al realizarse la inyección del ligando a la celda de la muestra, se genera un calor residual provocado por el proceso de desagregación del ligando cuando este se diluye.

Este calor de desagregación no suele ser constante, e interfiere en los parámetros de la unión del ligando al ADN. Como consecuencia, es necesario tenerlo en cuenta a la hora de realizar un análisis riguroso y acertado de los datos termodinámicos. Si el equilibrio de formación y ruptura del agregado es suficientemente rápido como para obtener experimentos válidos de ITC, cuyos datos se puedan analizar posteriormente de manera rigurosa, a pesar del proceso de agregación, se puede obtener un perfil termodinámico de la unión ligando ADN. Existen ejemplos en la bibliografía, donde para evitar los problemas ocasionados por la agregación en el estudio de la unión de la Daunorubicina con el ADN, se emplea un protocolo de modelo libre ITC (model-free ITC).²⁷ Gracias a este método, se pueden obtener valores estadísticos correspondientes a las entalpías de unión, aunque no determinar las constantes de asociación al ADN. Otra opción mediante la cual se puede obtener un perfil termodinámico completo, combinando el proceso de agregación y el proceso de unión al ADN, es realizar el análisis de los datos con el mencionado programa IC-ITC. Como ya se ha mencionado antes, este permite el análisis conjunto de los datos calorimétricos para encontrar los parámetros termodinámicos de todos los equilibrios involucrados en el experimento.

En nuestro caso concreto, desafortunadamente, los experimentos preliminares llevados a cabo con la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2**, indican que el equilibrio de ruptura del agregado es demasiado lento, dificultando mucho el estudio tanto de la unión al ADN, como el estudio del propio proceso de agregación. Además, los estudios preliminares con **2**, en principio indican, que la afinidad de las glico-oligoamidas catiónicas por el ADN va a ser moderada, por lo que el intervalo de concentraciones del ligando que pueden ser usadas en los experimentos es reducido. En el capítulo siguiente se tratará con mayor detalle el proceso de autoensamblaje de ligandos del ADN y se profundizará en el estudio de los agregados formados por las glico-oligoamidas catiónicas en disolución acuosa.

En la bibliografía, se encuentran referencias recientes de casos similares, donde tampoco ha sido posible obtener parámetros termodinámicos asociados a la unión de oligoamidas heteroaromáticas al ADN, por problemas ocasionados por la agregación de las propias oligoamidas. Sin embargo, el uso de DMSO como codisolvente y la elevada afinidad de dichas oligoamidas por el ADN, hace posible que se pueda disminuir su concentración lo suficiente como para poder obviar el proceso de agregación y obtener valores de entalpías de unión al ADN.²⁸ Desafortunadamente, como ya se ha comentado, en este caso el uso de DMSO como codisolvente tampoco solucionó los problemas experimentales.

Como última aproximación se decidió realizar una titulación inversa con la glico-oligoamida catiónica **2**. Es decir, en lugar de añadir el ligando concentrado sobre la disolución diluida de macromolécula, rellenar la jeringa de inyección con una disolución más concentrada de ADN y poner en la celda una disolución diluida de

²⁷ Ren, J. S.; Jenkins, T. C.; Chaires, J. B. *Biochemistry* **2000**, 39, 8439-8447.

²⁸ Wang, S.; Nanjunda, R.; Aston K.; Bashkin, J. K.; Wilson, W. D. *Biochemistry*, **2012**, 51, 9796-9806. (b) Wang, S.; Kumar, A.; Aston, K.; Nguyen, B.; Bashkin, J. K.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 8543-8545.

ligando. De esta forma, lo que se pretende es minimizar la dilución del ligando, y que en disolución haya suficiente glico-oligoamida catiónica libre, sin agregar, en el momento de cada inyección, para unirse al ADN que se va incorporando a la disolución. En primer lugar se llevó a cabo un experimento con una disolución 100 μM de glico-oligoamida catiónica de xilosa **2** y una disolución de FS-ADN 3.6 mM en tampón fosfato a 25 °C. Como se puede ver en la Figura 4.43, en este caso, después de cada inyección se recupera la línea base, con una separación entre inyecciones de 300 s, sin observarse el calor residual que distorsionaba los experimentos anteriores. Se obtiene un termograma en el que se pueden integrar sus señales, para obtener la correspondiente isoterma de unión.

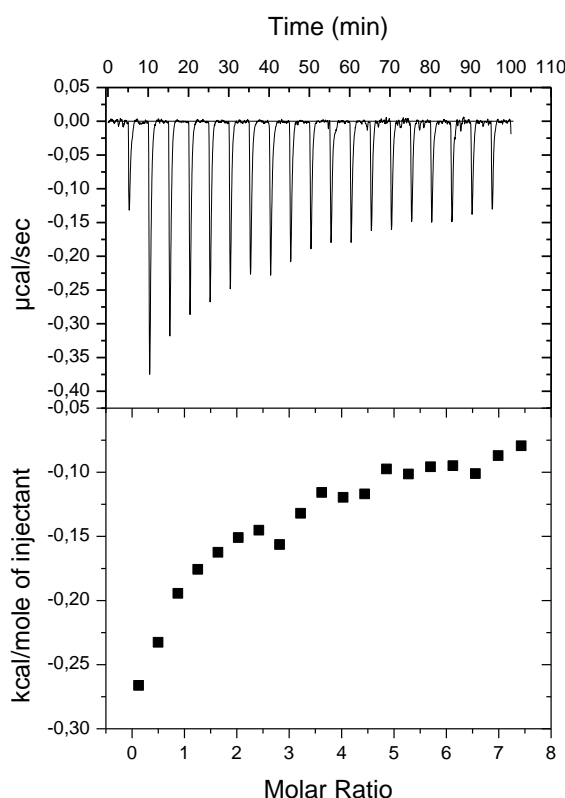


Figura 4.43 Titulación de FS-ADN [3.6 mM] con la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2** [100 μM] en tampón fosfato a 25 °C.

El uso de esta metodología de titulación inversa solo va a proporcionar constantes de asociación relativas, puesto que se está obviando el proceso de agregación. Sin embargo, va a ser posible evaluar semi-cuantitativamente la unión de las glico-oligoamidas catiónicas al ADN.

A nivel experimental, uno de los problemas que se encuentra realizando titulaciones inversas, es la elevada concentración de ADN que se requiere en la jeringa. En una titulación normal con ADN, en la jeringa se necesita una concentración de ligando unas 12 veces mayor que la concentración de los sitios de unión al ADN que hay en la celda. Esto se debe a que el volumen de la jeringa es aproximadamente de unos 300 μL y el de la celda de unos 1500 μL , el ligando de la jeringa se va a diluir cinco

veces.²⁹ Así que, empezando con una concentración doce veces mayor en la jeringa, en el punto final de la titulación habrá más o menos dos veces más ligando en la celda que sitios de unión. Por lo tanto, en una titulación inversa, la concentración de ADN de la jeringa debe ser doce veces mayor en pares de bases que la del ligando en la celda, pero además hay que tener en cuenta los pares de bases que ocuparía una glico-oligoamida catiónica. De acuerdo con estudios previos de nuestro grupo de investigación, las glico-oligoamidas neutras ocupan tres pares de bases,³⁰ por lo que se asumió que los análogos catiónicos ocuparían también tres pares de bases. De este modo, para una concentración de ligando en la celda de 225 μM , se necesitaría una concentración de 8.1 mM en pares de bases de ADN en la jeringa. Con determinados polímeros de ADN, no es posible alcanzar concentraciones tan elevadas, o bien, por problemas experimentales (viscosidad de la disolución) o bien, por su elevado coste. Así, el intervalo de concentraciones que se puede emplear para diseñar los experimentos de titulaciones inversas, es reducido, tanto por los problemas de agregación de las glico-oligoamidas catiónicas como por las elevadas concentraciones de ADN de la jeringa.

Para validar el método, se realizó otro experimento con el derivado catiónico de xilosa **2** a una concentración de 225 μM con FS-ADN 8.1 mM. Esta valoración, se compone de tres valoraciones consecutivas. En principio, como se obvia el proceso de auto-asociación, la titulación muestra un único proceso de unión de la glico-oligoamida catiónica al ADN. De acuerdo con la Figura 4.44, la interacción del derivado catiónico con el ADN es un proceso exotérmico.

²⁹ Esto sucede para el caso concreto del instrumento MicroCal™ VP-ITC.

³⁰ Peñalver, P.; Marcelo, F.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4561-4570.

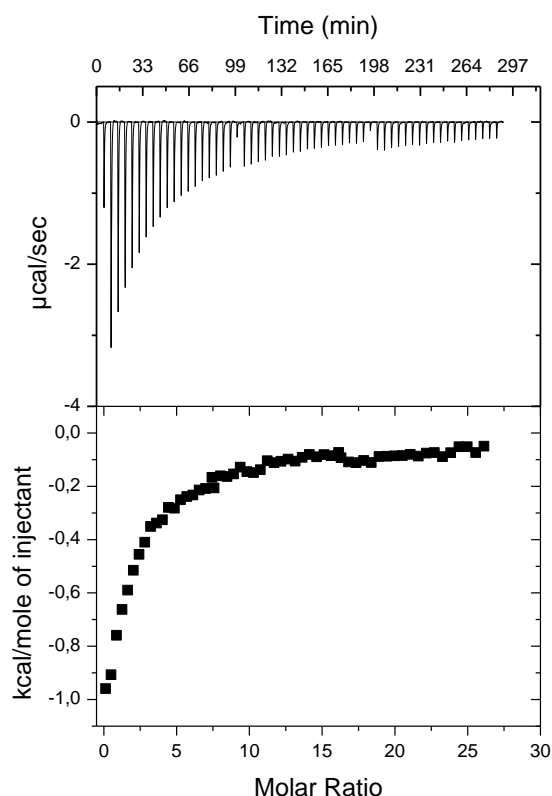


Figura 4.44 Titulación inversa de FS-ADN [8.1 mM] con la glico-oligoamida catiónica de xilosa 2 [225 μ M] en tampón fosfato a 25 °C, compuesta por tres valoraciones consecutivas.

Una vez optimizado el método de titulación inversa, se quiso estudiar con más detalle la interacción de las glico-oligoamidas catiónicas de D y L-manosa (**3** y **4**) con el ADN. Para ello se llevaron a cabo titulaciones de ambos compuestos con Poly(dA-dT)₂ y con FS-ADN, en tampón fosfato 10 mM (pH= 7.2), con un 7% de DMSO, a 25 °C. Como se ve en la Figura 4.45, ambos procesos de unión son exotérmicos y muestran un solo proceso de unión. En esta situación de valoración inversa, la cantidad de ligando que se une al ADN cuando este se adiciona, podría estar limitada por la disponibilidad de ligando monomérico en disolución y por la velocidad de ruptura de los agregados. Es decir, si en el momento de cada adición no hubiera suficiente ligando libre disponible para unirse al ADN, se obtendría un calor de unión limitado por el proceso lento de ruptura de los agregados y por la disponibilidad de ligando libre en disolución. Por este motivo, se decidió variar el volumen de cada inyección alternativamente entre 10 y 20 μ L, tal y como se aprecia en los termogramas. De esta forma, se comprueba que la agregación no está interfiriendo en las medidas de unión al ADN. En principio, al integrar el área de cada señal para obtener la isoterma de unión, como esta se expresa en kcal/mol de compuesto inyectado, si ese calor corresponde a la unión al ADN y no está limitado por el proceso lento de ruptura de agregados, se deberían obtener dos series de datos que forman una única isoterma de unión, como así sucede.

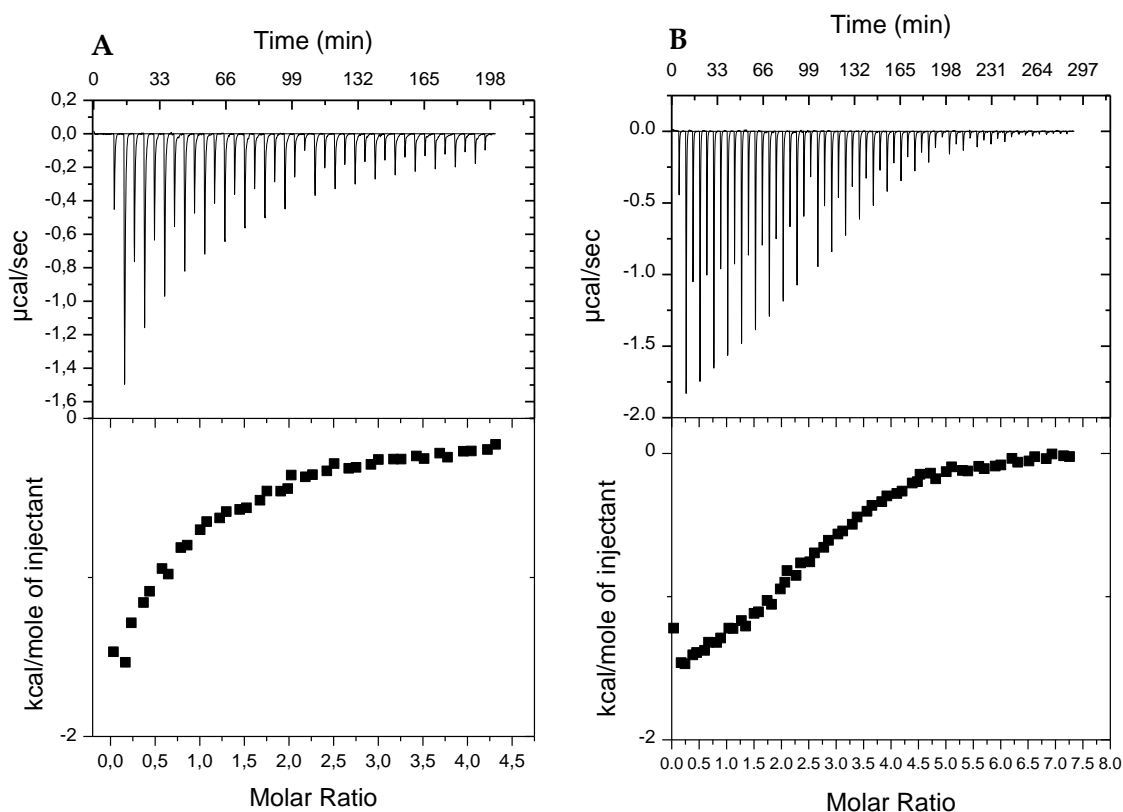


Figura 4.45 A) Titulación inversa de Poly(dA-dT)₂ [1.925 mM] con la glico-oligoamida catiónica de D-manosa 3 [200 μM] compuesta por dos titulaciones parciales en tampón fosfato a 25 °C. B) Titulación inversa de Poly(dA-dT)₂ [2.0 mM] con la glico-oligoamida catiónica de L-manosa 4 [200 μM] compuesta por tres titulaciones parciales en tampón fosfato a 25 °C.

Para analizar los datos obtenidos de las valoraciones se empleó IC-ITC.^{25b} Los datos se ajustaron en base un modelo correspondiente a un sitio de unión. En este programa, el buen ajuste de los datos se evalúa y cuantifica empleando el parámetro $\Sigma dev^2/dof$ (sumatorio de la desviación estándar al cuadrado entre los grados de libertad) que viene dado por la siguiente ecuación.

$$\sum dev^2/dof = \frac{\sum_{i=1}^N [q_i - q(i; a)]^2}{dof}$$

Donde **a**, es un conjunto de parámetros termodinámicos que describen la interacción. $q(i; a)$ es el calor calculado por inyección *i* para el conjunto de parámetros termodinámicos **a**. *dof* son los grados de libertad, es decir, el número de puntos del experimento menos el número de variables optimizables. Este parámetro, $\Sigma dev^2/dof$, se calcula mediante el algoritmo simulated annealing (SA).³¹ Por lo tanto, para evaluar el ajuste y obtener los márgenes de error de las distintas variables es necesario representar las trayectorias de los valores de las variables obtenidas durante el SA, frente a los valores de $\Sigma dev^2/dof$ mínimos obtenidos. Además, para ver la correlación

^{25b} Buurma, N. J.; Haq, I. *Methods* **2007**, *42*, 162-172

³¹ Metropolis, N.; Rosenbluth, A. W.; Rosenbluth, M. N.; Teller, A. H.; Teller, E., *J.Chem. Phys.* **1953**, *21*, 1087-1092.

de las diferentes variables en función de los estándares de calidad del ajuste, y encontrar los mínimos de los parámetros, se pueden representar gráficas 3D.

Para la titulación de la glico-oligoamida catiónica de L-manosa **4**, el ajuste de los datos es bastante bueno. La siguiente Figura 4.46, muestra la representación bidimensional del error para los parámetros ajustables K_A , ΔH_A y n_A , en términos de la representación de $\Sigma dev^2 / dof$ normalizada como una función del valor del parámetro optimizable. En estas gráficas se obtiene una parábola para los tres parámetros, lo cual indica el “buen comportamiento” de los márgenes de error. Los dos márgenes de error se distribuyen casi de manera simétrica entorno al parámetro optimizado, que es el mínimo de la parábola.

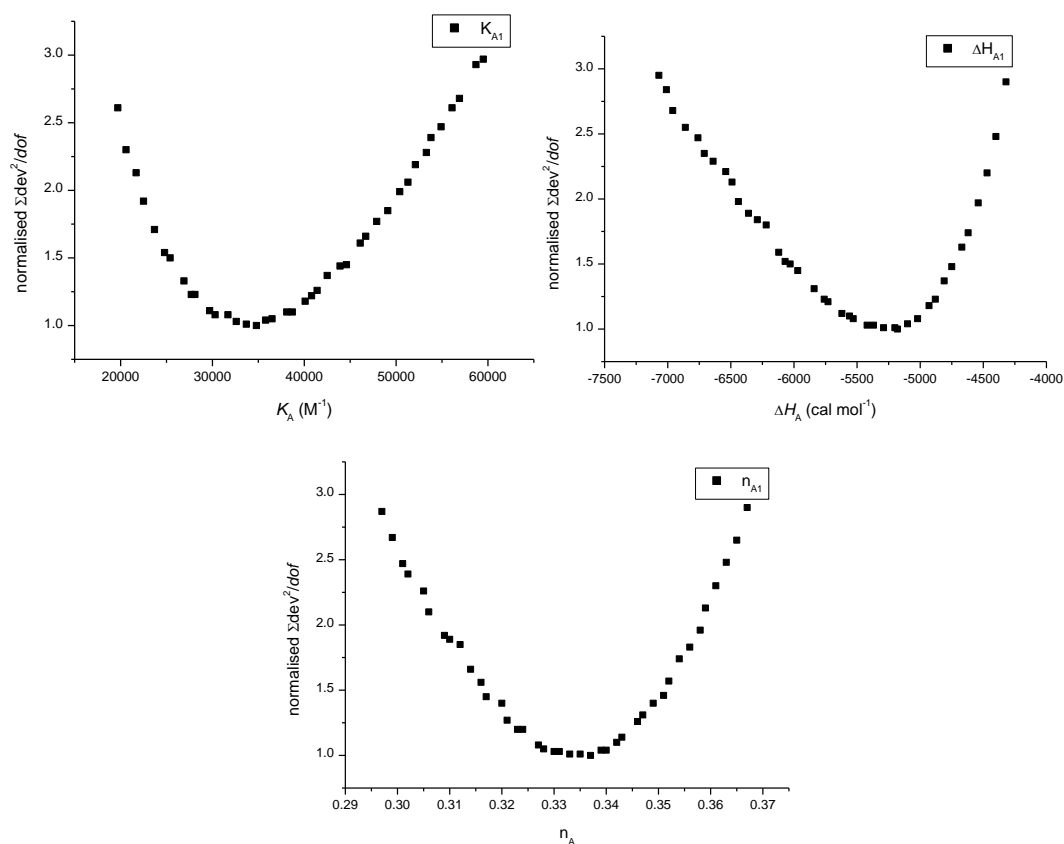


Figura 4.46 Márgenes de error de los parámetros optimizables obtenidos de la titulación de la glico-oligoamida catiónica de L-manosa con Poly(dA-dT)₂. Σdev^2 normalizada/dof como función de valor variable para K_A , ΔH_A y n_A .

Cuando se representa $\Sigma dev^2 / dof$ normalizada como función de dos de las diferentes combinaciones de variables de la titulación, se obtienen gráficas 3D como las que aparecen en la Figura 4.47. En el eje z se sitúa $\Sigma dev^2 / dof$ normalizada, en los ejes x e y las otras dos variables escogidas. Por lo tanto en estas gráficas, además se puede ver si existe correlación entre las distintas variables, es decir, si existen diversas combinaciones de diferentes parámetros que reproduzcan los datos experimentales bien. Para este caso, se observan zonas de mínimos bastante bien definidas, indicando que hay poca correlación entre las distintas variables y por tanto, estas están bien definidas.

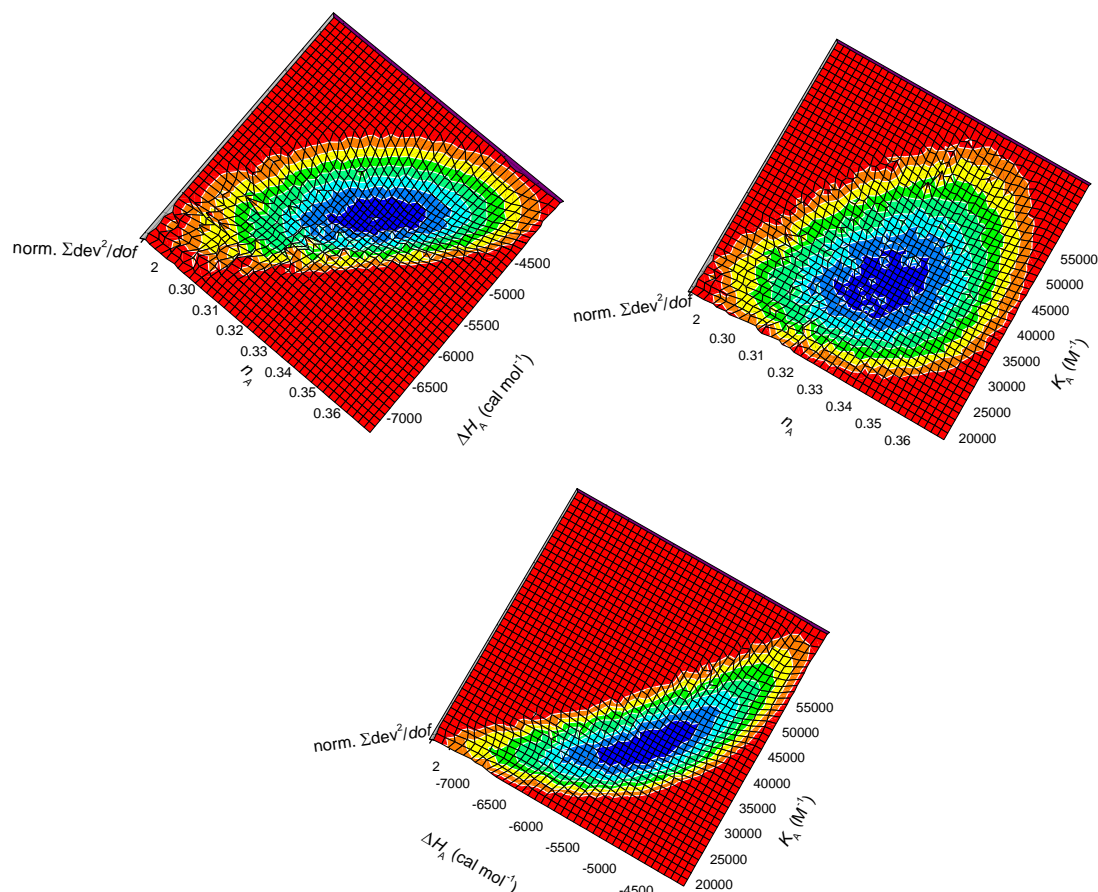


Figura 4.47 Σdev^2 normalizada/dof como función de valores de ΔH_A y n_A (izquierda), como función de K_A y n_A (derecha) y como función de ΔH_A y K_A (abajo).

La Tabla 4.15 recoge los parámetros termodinámicos optimizados obtenidos del análisis conjunto de las tres valoraciones independientes de la glico-oligoamida catiónica de L-manosa (**4**) y Poly(dA-dT)₂.

Tabla 4.15 Parámetros termodinámicos de la unión de la glico-oligoamida catiónica de L-manosa **4** al Poly(dA-dT)₂ en tampón fosfato con 7% de DMSO, pH = 7, a 25 °C.

K_A (10 ⁴ M ⁻¹)	ΔH (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)	n_A
3.5 (2.3; 5.1)	-5.2 (-4.5; -6.4)	1.0	0.34 ± 0.02

^a Los valores mostrados entre paréntesis corresponden al margen de error del parámetro optimizado, obtenidos de los ajustes con valores de $\Sigma dev^2 / dof$ normalizada inferiores a 2.

En primer lugar, cabe destacar, que la glico-oligoamida derivada de L-manosa se une al Poly(dA-dT)₂ con una afinidad moderada, en un orden de magnitud de 10⁴ M⁻¹. De acuerdo con la estequiometría obtenida (n_A) cada glico-oligoamida catiónica ocupa tres pares de bases, lo que concuerda con el valor estimado para las glico-oligoamidas neutras. La unión del ligando (**4**) al Poly(dA-dT)₂ está favorecida tanto entrópicamente, como entálpicamente, siendo mayor la contribución de la entalpía. Los valores obtenidos de ΔH_A y $-T\Delta S$ para la glico-oligoamida catiónica con Poly(dA-dT)₂ están en

consonancia con los valores descritos para otros ligandos del surco menor del ADN.³² La mayor contribución entálpica vendría dada por el establecimiento de enlaces de hidrógeno entre el ligando y el Poly(dA-dT)₂, además de por interacciones de van der Waals. Al mismo tiempo, la contribución entrópica podría tener su origen en la liberación de moléculas de agua de la “espina de hidratación” del surco menor del Poly(dA-dT)₂ cuando el ligando interacciona con este.³³ Además, al ser un ligando cargado, también podría deberse a la liberación de cationes debido al llamado efecto polielectrolito.³⁴

Desafortunadamente, para la valoración con la glico-oligoamida de D-manosa **3**, el análisis de los datos resulta más complejo. Al igual que en el ejemplo anterior se realizó el ajuste en términos de un sitio de unión sin ningún tipo de restricción en los parámetros. Este ajuste reprodujo bien los datos experimentales, aunque dio valores de K_A muy bajos (1.61 M^{-1}) y valores de n_A irreales (1.62×10^{-3}). El análisis de los márgenes de error reveló que para estos dos parámetros (K_A y n_A), no se definían bien sus márgenes de error. Probablemente lo que está sucediendo, es que la K_A es tan baja, que el ajuste genera un número irrealmente grande de sitios de unión para que pueda existir algo de unión. Cuando se representa la gráfica 3D para analizar $\Sigma \text{dev}^2 / \text{dof}$ normalizada como función de los valores de las diferentes variables, se ve una gran correlación entre K_A y n_A (Figura 4.48). Como los valores de K_A son tan bajos, la estequiometría aumenta para compensarlo. En las ecuaciones empleadas para ajustar los datos, K_A y n_A aparecen en muchos términos como K_A/n_A , por lo tanto, para sistemas donde no está bien definida la estequiometría, solo se obtienen valores razonables para el cociente de ambas. Para intentar obtener datos de K_A se decidió realizar el ajuste restringiendo la estequiometría a 0.33, es decir, un tamaño de sitio de unión de 3 pares de bases. Esta restricción, parte de la obtención de este valor de n_A para el otro diastereómero, y permite realizar una buena comparación, eliminando el problema de la relación K_A/n_A .

³² Chaires, J. B. *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, 453, 26-31.

³³ Kopka, M.L.; Yoon, C.; Goodsell, D.; Pjura, P.; Dickerson, R.E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 1376-1380.

³⁴ (a) Manning, G.S.; *Q. Rev. Biophys.* **1978**, 11, 179-246. (b) Record Jr., M.T.; Anderson, C.F.; Lohman, T.M. *Q. Rev. Biophys.* **1978**, 11, 103-178.

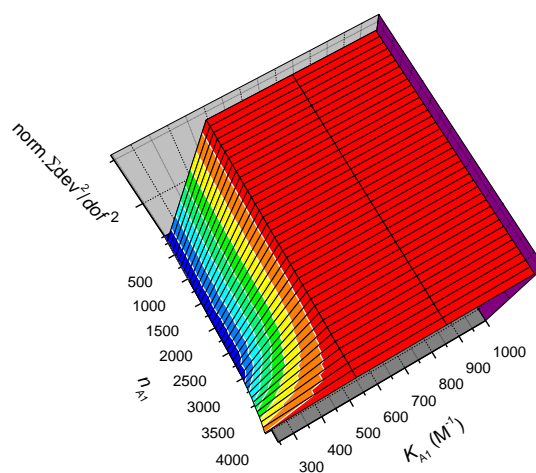


Figura 4.48 Σdev^2 normalizada/dof como función de los valores de K_A y n_A .

Al restringir el dato de la estequiometría a 0.33 el ajuste de los datos es peor, y por lo tanto da unos márgenes de error muy amplios y siguen sin definirse bien. En principio, parece que con estos datos experimentales no es posible definir unos valores exactos para estos parámetros.

Aun así, todo parece indicar que el derivado catiónico de L-manosa **4**, es un ligando más fuerte que el derivado de D-manosa **3**, frente a Poly(dA-dT)₂. El análisis de los datos de este último resulta más complejo precisamente por ser un ligando más débil. En general, en el análisis de datos de ITC de ligandos débiles se encuentra mucha correlación entre parámetros y esto dificulta su análisis. En este caso la comparación clave entre estos sistemas se encuentra en las gráficas de los márgenes de error de la constante de asociación (K_A) (Figura 4.49). Los márgenes de error de K_A para las distintas titulaciones de la glico-oligoamida catiónica de L-manosa se superponen, lo cual da consistencia a los resultados. Al mismo tiempo, este conjunto de curvas no se superponen con las obtenidas en las titulaciones del compuesto de D-manosa, las cuales aparecen a valores menores de K_A . Esto indica, que, efectivamente, la unión al Poly(dA-dT)₂ del derivado catiónico de L-manosa **4**, es significativamente más fuerte que la del derivado catiónico de D-manosa **3**. La mala definición de las curvas de márgenes de error de las titulaciones de la glico-oligoamida de D-manosa, donde no se encuentra un mínimo aceptable y hay mucha covarianza entre los distintos parámetros ajustables, es indicativo de que se trata de un ligando débil, con un valor para K_A inferior a 10^4 M^{-1} . Aun así, también hay que mencionar, que al ser compuestos diastereómeros, pueden tener distintas propiedades de agregación, y el derivado de D-manosa puede tener interacciones más fuertes consigo mismo y ser su ruptura cinéticamente más lenta.

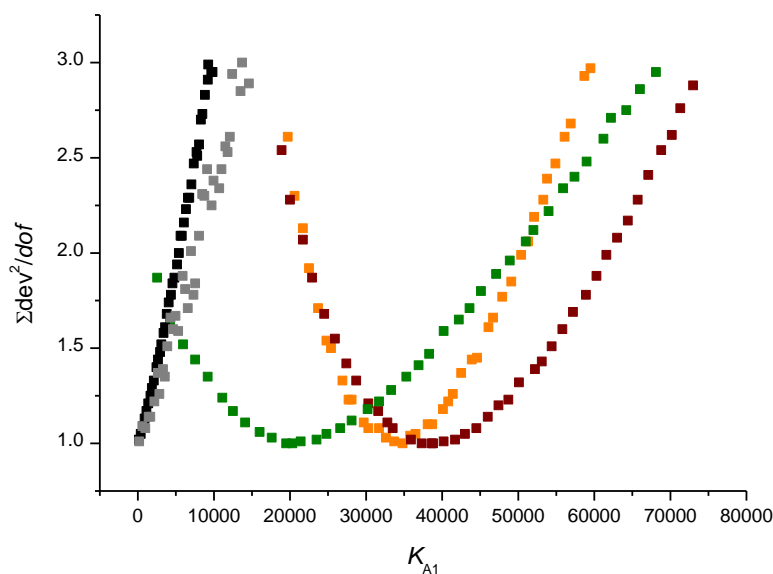


Figura 4.49 Márgenes de error de K_{A1} de tres valoraciones del derivado de L-manosa **4** (curvas verde, naranja y granate) con Poly(dA-dT)_2 y de dos valoraciones del derivado de D-manosa **3** (curvas negra y gris) con Poly(dA-dT)_2 . Σdev^2 normalizada/dof como función de los valores variables de K_{A1} .

Después de analizar la unión de ambos ligandos (**3** y **4**) con secuencias AT, se quiso realizar el estudio con secuencias GC. Desafortunadamente, la afinidad de las glico-oligoamidas catiónicas por secuencias GC es menor, y no se pudieron optimizar las condiciones del experimento puesto que las afinidades estaban fuera de los límites de detección de la técnica. En su lugar, se realizaron titulaciones inversas con FS-ADN. La inspección de los termogramas revela una disminución de la afinidad en el caso del derivado de L-manosa **4** (Figura 4.50). De nuevo, los intentos por realizar un buen ajuste de los datos y lograr valores termodinámicos que caractericen la unión, no dieron lugar a resultados fiables. En esta ocasión, la situación es más compleja, porque al ser FS-DNA un polímero con secuencias aleatorias (40% GC, 60% AT), hay más de un tipo de sitio de unión, al contrario de lo que sucedía con el Poly(dA-dT)_2 . Por esta razón, lo que puede estar sucediendo, es que debido a que las glico-oligoamidas han demostrado tener cierta selectividad de secuencia, en cada nueva adición de ADN, los ligandos ya unidos cambian su sitio de unión a otro por el cual tienen mayor afinidad. A pesar de no haber podido cuantificar la interacción en esta ocasión, se ha confirmado la preferencia de las glico-oligoamidas catiónicas (**3** y **4**) por secuencias AT frente a GC.

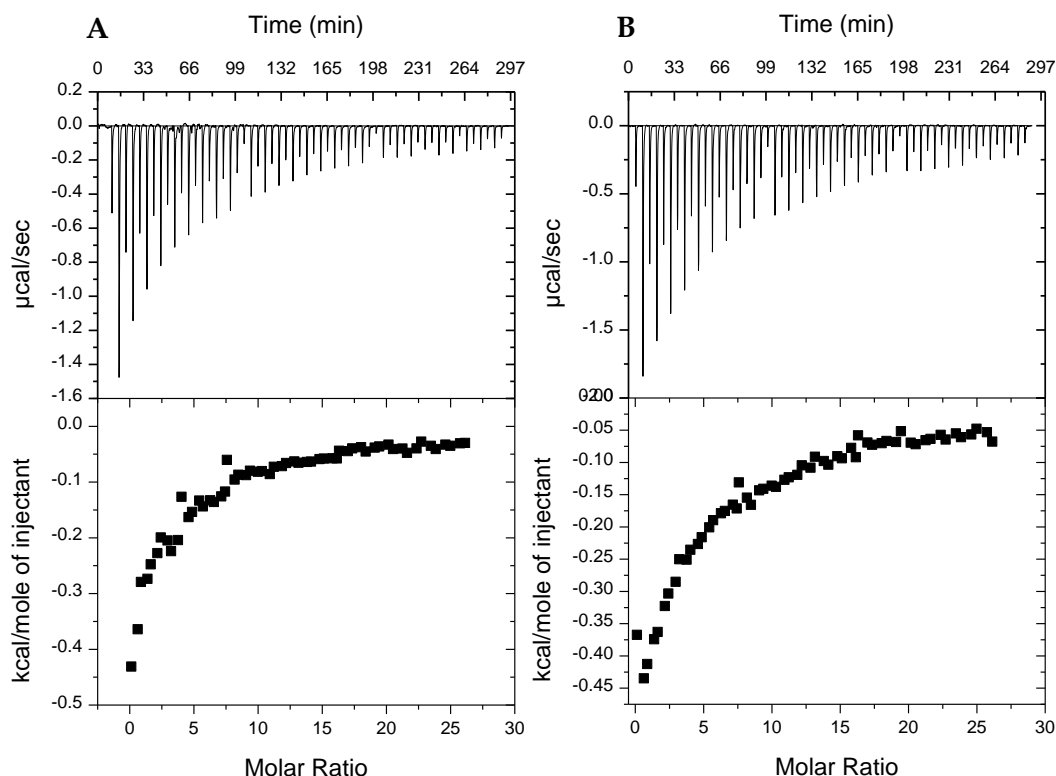


Figura 4.50 Titulación inversa de FS-ADN [7.2 mM] con las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa 3 [200 μ M] (derecha) y L-manosa 4 [200 μ M] (izquierda) en tampón fosfato a 25 °C.

4.5 Conclusiones del capítulo

El análisis conformacional ha mostrado que los derivados de D y L-manosa (**3** y **4**) en el estado libre en agua, presentan una estructura de horquilla bien definida. Se ha podido detectar una orientación concreta de la cara α del carbohidrato hacia el indol en la conformación mayoritaria en agua de ambas glico-oligoamidas. Además, se ha podido definir un plegamiento mayoritario en disolución

Se ha logrado detectar todas las señales de los protones intercambiables (NH y OH) por RMN, y caracterizar el enlace de hidrógeno entre NH-5...OH-2 de ambas glico-oligoamidas catiónicas (**3** y **4**) en agua por RMN.

En ambos derivados catiónicos la conformación en el estado libre es similar a la encontrada en el estado enlazado con los diferentes polímeros de ADN; conformación plegada de horquilla con la cara α del carbohidrato hacia el indol, formando dos arcos, arco NH y arco NMe.

En cuanto a la orientación del carbohidrato en el estado enlazado, en el caso de los complejos de glico-oligoamidas catiónicas (**3** y **4**) con poly(dA-dT)₂, se ha podido definir una orientación del carbohidrato dentro del surco menor del ADN. Para el derivado de D-manosa (**3**), los centros C2 y C3 se sitúan hacia el interior del surco, sin embargo para el caso del derivado de L-manosa (**4**) no se ha definido una disposición concreta. En los complejos con poly(dG-dC)₂, se han encontrado diferencias en ambos

complejos. Para el complejo del derivado de D-manosa (**3**), el OH2, posible centro dador de enlace de hidrógeno cooperativo, quedaría hacia fuera del surco menor del ADN. Por el contrario, en el caso del derivado de L-manosa (**4**), ese mismo OH2 quedaría hacia dentro del surco menor, pudiendo participar en un proceso de interacción cooperativo intermolecular con el ADN.

Los experimentos de interacción por RMN apuntan a que hay diferencias de afinidad entre las glico-oligoamidas catiónicas (**3** y **4**), aunque ambas presentan una preferencia por secuencias de bases AT. El derivado de L-manosa muestra una mayor afinidad por ambos polímeros de ADN (poly(dA-dT)₂ y poly(dG-dC)₂). En el caso del poly(dG-dC)₂, esta mayor afinidad puede deberse a la orientación del OH2 hacia el interior del surco menor del ADN, pudiendo participar como dador cooperativo de enlace de hidrógeno en un proceso intermolecular con el ADN.

Mediante los experimentos de CD, se ha comprobado que las glico-oligoamidas catiónicas no inducen un cambio en la conformación del ADN de B a Z.

Al llevar a cabo experimentos de interacción por ITC, se ha descubierto un posible proceso de agregación de las glico-oligoamidas catiónicas en agua. Además, los experimentos de ITC apuntan a que el equilibrio de formación y ruptura de agregados es un proceso lento, lo cual supone un problema a la hora de usar esta técnica. A pesar de esta problemática, se ha logrado optimizar una metodología de valoraciones en modo reverso, que posibilita el uso de esta técnica para obtener de una manera aproximada información termodinámica sobre la interacción obviando el proceso de agregación. De esta manera, se ha podido caracterizar termodinámicamente la interacción del derivado de L-manosa, β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**), con Poly(dA-dT)₂, obteniéndose una afinidad de $3.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Gracias a estos experimentos, se han podido corroborar los resultados de afinidad cualitativos obtenidos mediante RMN. La glico-oligoamida catiónica derivada de L-manosa (**4**) es mejor ligando que el derivado de D-manosa (**3**) frente a Poly(dA-dT)₂. Además, también se ha confirmado la preferencia de estos ligandos por secuencias AT frente a secuencias GC.

4.6 Experimental section

4.6.1 Sample preparation for NMR experiments

NMR sample solutions from 500 μM to 100 μM were prepared from a stock solution of cationic glyco-oligoamide 10^{-3} M in a mixture of MeOH and H_2O . Aliquots of different volumes from this stock solution were transferred to several Eppendorfs and the resulting samples were lyophilized. The chosen transferred volume should be the appropriate so when the dried solid is dissolved again in 0.5 mL, the desired concentration is reached.

Additionally, phosphate buffer (PBS) dried samples were also prepared. 1 mL volume samples of PBS 10 mM were prepared in eppendorfs and lyophilized to dryness.

In order to be able to calculate the final concentration of the samples, 3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- d_4 acid sodium salt (TSP) was used as internal reference (20 μM).

The procedure to prepare the NMR samples is shown in Figure 4.1. 10 μL of a stock solution (10^{-2} M) of TSP in water were added to 5 mL of deuterium oxide or H_2O , giving a final solution of 20 μM TSP solution in D_2O . 1 mL of that solution was added to a lyophilized PBS sample and vortex for 3-5 minutes, so the pH of the sample is adjusted around 7.2. Finally, 0.5 mL of that solution were added to the lyophilized cationic glyco-oligoamide sample. Depending on the solubility of the sample, the solution was sonicated for 5 minutes.

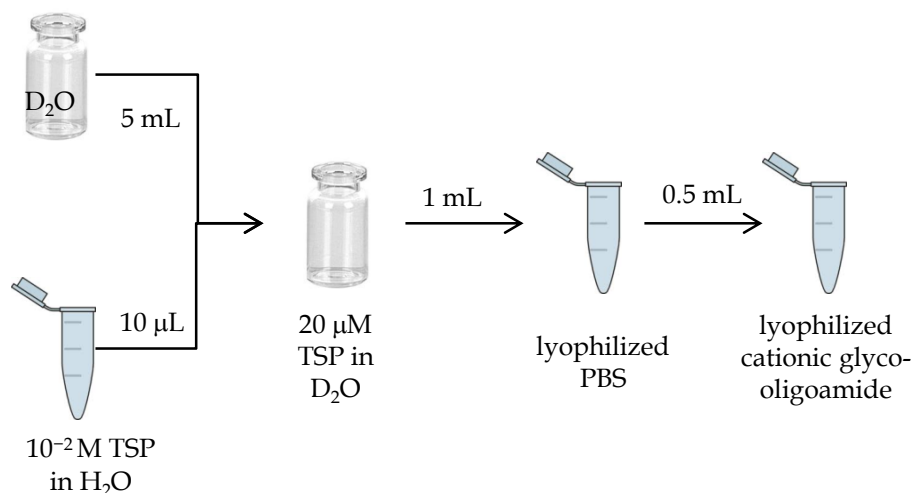


Figure 4.1 General procedure to prepare NMR samples

4.6.2 Hydrogen bonding characterization by NMR

Variable temperature ^1H -NMR experiments and NOESY experiments were performed on a Bruker DMX500 spectrometer. The 1D and 2D experiments were acquired by using excitation sculpting with the gradient method to suppress the water

signal and by employing standard Bruker pulse sequences. Mixing time of 400 ms was used for recording NOESY experiments at $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. The temperature coefficient values ($\Delta\delta/\Delta T$) of the exchangeable proton resonances of (**2-4**) cationic glyco-oligoamides and carbohydrate models (**5** and **6**) in H_2O :Acetone (90:10) were obtained by means of variable-temperature NMR spectroscopic analysis. Concentration of cationic glyco-oligoamides and carbohydrate model were from $300\text{ }\mu\text{M}$ to $600\text{ }\mu\text{M}$ depending on the solubility of the compound in water. The ^1H -NMR spectra were recorded at four different temperatures in the range 0°C to $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.6.3 NMR structural studies

The NMR study of the cationic glyco-oligoamides **3** and **4** in water solution was performed using $500\text{ }\mu\text{M}$ samples in D_2O . Standard 2D-methods, such as COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, ROESY and NOESY experiments were employed to assign the ^1H -NMR signals, using Varian System 500 MHz.

NOESY and ROESY (mixing times 400-600 ms) experiments in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10) as well as in H_2O using a D_2O capillary as external reference were recorded on Bruker Avance 500 MHz NMR spectrometer. NMR spectra were recorded at $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ and at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Monodimensional ^1H -NMR comparative study between cationic glyco-oligoamide (**3** and **4**) and single strand carbohydrate model (**6**) was performed on Bruker Avance 500 MHz spectrometer. Water suppression was achieved by using an excitation sculpting sequence (zgpg30).

4.6.4 NMR interaction studies

All NMR interaction studies with DNA polymers were performed on a Bruker Avance 500 MHz spectrometer. DNA concentration measurements were carried out on a UV/Visible Perkin-Elmer Lambda 35 spectrophotometer, and concentrations were expressed in base pair.

DNA sample preparation

DNA solutions were prepared by adding a certain volume of $20\text{ }\mu\text{M}$ TSP in D_2O solution directly to the DNA vial. DNA solutions were gently shaken for 30 minutes. DNA concentrations were determined spectrophotometrically using $\epsilon_{260\text{ nm}} = 13200\text{ M (bp)}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ for Poly(dA-dT)₂ and $\epsilon_{254\text{ nm}} = 16800\text{ M (bp)}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ for Poly(dG-dC)₂. Purity of DNA solutions was checked by UV-visible spectroscopy from the ratio $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$, which was found to be in the right range (1.8 - 2.0), suggesting that both solutions are essentially free of protein or RNA.

NMR Titration

Cationic glyco-oligoamide solution was prepared as explained above. First, in order to calculate concentration of the sample by comparison with TSP signal, a ^1H -NMR spectrum was recorded. The following procedure (Figure 4.2) was designed to keep constant glyco-oligoamide concentration all along the NMR titration. Once the

real concentration was calculated, cationic glyco-oligoamide solution was poured into an Eppendorf. Half of the glyco-oligoamide solution (250 μL) was poured in an Eppendorf, diluted by half with 250 μL of 20 μM TSP solution in D_2O and placed back into the NMR tube. Again a ^1H -NMR spectrum was recorded to check that concentration is half of the previous one.

Then, the other half of the glyco-oligoamide solution (250 μL) was placed in another Eppendorf and 250 μL of DNA solution were added. As a consequence, glyco-oligoamide solution was diluted by half. This final solution with a mixture of DNA and ligand will be added progressively to the NMR tube. In this way, with every DNA addition, glyco-oligoamide is added also, and ligand concentration remains constant.

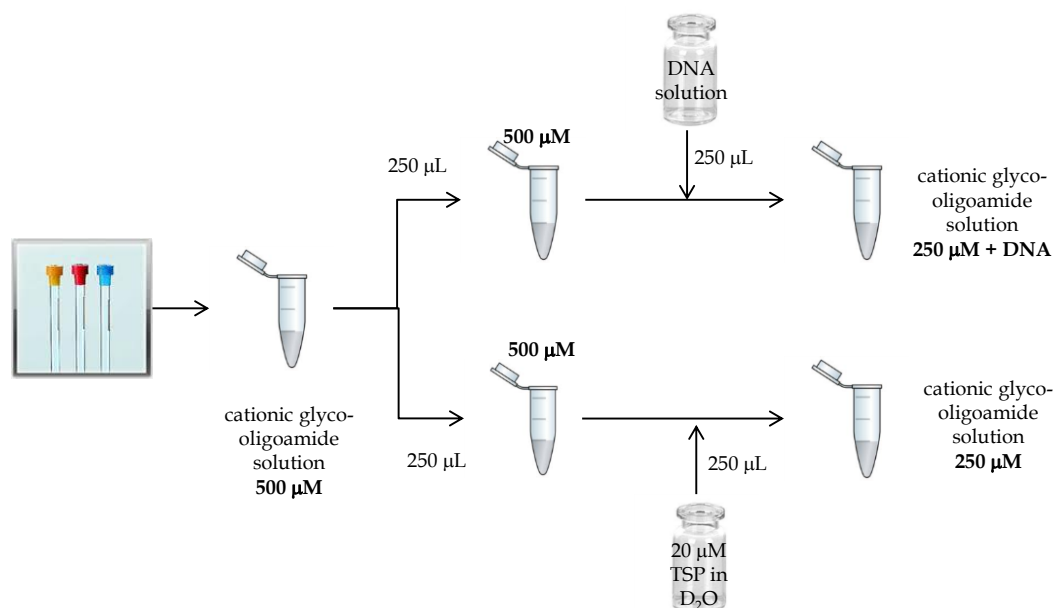


Figure 4.2 General procedure for NMR titration sample preparation

Subsequently, increasing amounts of the titrant DNA solution were added while keeping constant ligand concentration. For every addition a ^1H NMR spectrum was recorded in the same conditions (64 scans, $d1=5\text{s}$, 25°C), and line broadening was monitored until complete disappearance of the proton signals.

NMR Competition experiment with Netropsin

Once the titration experiment is finished, so the resonances of the cationic glyco-oligoamide (**3** and **4**) have disappeared from the ^1H -NMR spectrum, 20 μL of netropsina solution 10^{-2}M in buffer phosphate D_2O solution were added to the NMR tube and another ^1H -NMR spectrum was recorded to monitor the evolution of the signals. Upon sequential additions of netropsin solution, reappearance of the glyco-oligoamide (**3** and **4**) resonances was monitored by recording ^1H -NMR after each addition.

NMR Competition experiment between neutral glyco-oligoamide (35 and 36) and cationic glyco-oligoamide analogue (3 and 4)

For these competition experiments, a ^1H -NMR spectrum of the buffer solution containing both ligands, cationic and neutral, in the same concentration (220 μM for D-mannose derivatives and 275 μM for L-mannose derivatives) was recorded. Then increasing amounts of poly-(dA-dT)₂ (5.6 mM bp) were added and ^1H -NMR spectra were recorded after each addition. Signal intensities of the ligand showing higher affinity for the DNA decrease more quickly.

TR-NOESY experiments

The bound-state NMR experiments were carried out once the spectra of the free ligand was clear but slightly broadened (Ligand/DNA ratio, 1/0.1 for Poly(dG-dC)₂ and 1/0.05 for Poly(dA-dT)₂). TR-NOESY experiments for the bound ligand were performed on a Avance Bruker 500 MHz spectrometer with saturation of the residual H₂O signal or with the Watergate pulse sequence. TR-NOESY experiments were recorded in D₂O at 25 °C, and H₂O: D₂O (90:10) in this case at 5 °C to minimize the hydrogen/deuterium exchange. The mixing time used for both cases was 200 ms. Negative and intense NOEs (which are indicative of binding to the macromolecule) were found in all of the experiments; these were in contrast with the weak NOEs observed in the free state conformation for cationic glyco-oligoamides 3 and 4.

DF-STD experiments

STD experiments for the bound ligands were performed on a 500 MHz AVANCE Bruker spectrometer using D₂O as a solvent. Either no water suppression or the Watergate sequence was used depending on the obtained signal/noise ratio without solvent suppression. A ligand/receptor molar excess of up to 1/0.1 was used for the best STD effects.

The STD effects of the individual protons were calculated for each compound relative to a reference spectrum with off-resonance saturation at $\delta=50$ ppm. 128 scans were recorded for the reference STD spectrum. The best duration of the saturation pulse, the power of the selective Gaussian pulse, and the recycling delay were optimized to get the best possible signal/noise ratio with no spin diffusion within a reasonable experimental time. The final experiments were performed at 298 K with a recycling delay of 4 s, an acquisition time of around 1.3 s, and a saturation time of 400 ms. The saturation was accomplished by using 8 Gaussian shaped pulses of 49 ms each, separated by 1 ms, with an approximate power of $\gamma B=20$ Hz. Two saturation frequencies were selected: $\delta=4.50$ ppm (to hit the H4', H5', and H5'' region of deoxyribose in DNA) and $\delta=5.60$ ppm (to hit the H1' region in DNA). Control experiments performed without the DNA receptor showed that no effect was observed in the ligand protons when the H1' region ($\delta=5.60$ ppm) in DNA was chosen, whereas less than 6% saturation was observed for some protons (MeA and MeB), at on-resonance saturation at $\delta=4.50$ ppm. The intensities due to saturation observed in the

control experiments were subtracted from the intensities observed in the presence of DNA to calculate the STD intensities. The intensity of each peak in the STD spectra was standardized in relation to a proton resonance the intensity of which was assigned to be 100. The normalization of the signal intensity was done relative to Py-3 and Ind-3. Both sets of data treatment rendered identical conclusions. Such conclusions were obtained by comparing the normalized value of each proton resonance intensity upon irradiation of the outer or inner region of the DNA groove.

4.6.5 ITC experimental section

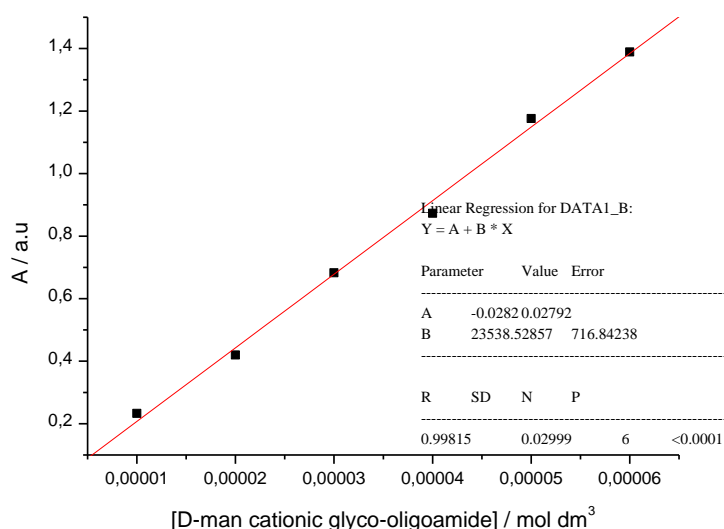
Cationic glyco-oligoamide solutions

All ligand solutions were prepared in phosphate buffer 10 mM, pH 7.2, with a 7% of DMSO as cosolvent, by dissolving cationic glyco-oligoamide in the suitable volume of DMSO and then, adding the phosphate buffer. Subsequently, solutions were filtered with a syringe filter. Concentrations were determined by UV-Vis spectroscopy, based on the extinction coefficients (typically in the range 700-100 μM). UV-visible spectra were recorded using a Jasco V-630Bio or Jasco V-650 UV-visible spectrophotometer coupled with a Peltier temperature controller at 25 °C.

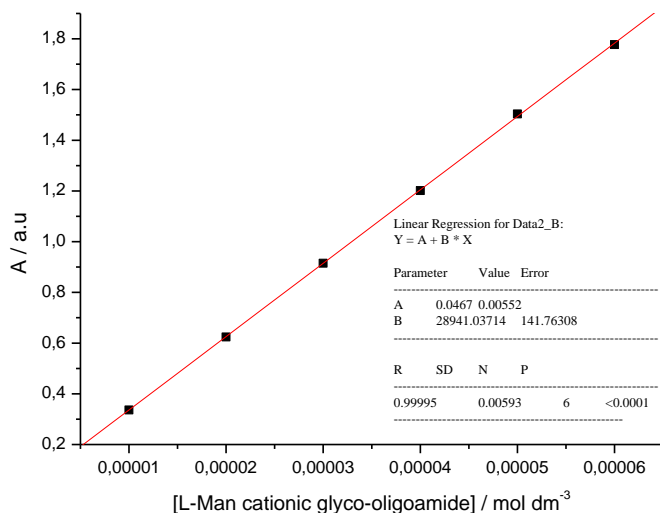
Molar extinction coefficients (ϵ) calculation of cationic glyco-oligoamides 3 and 4

In order to be able to quantify spectrophotometrically the concentrations of the cationic glyco-oligoamides solutions for ITC experiments, molar extinction coefficients (ϵ) of compounds **3** and **4** were calculated in phosphate buffer with 7% of DMSO.

A stock solution of **3** (6.00 mM) in DMSO was prepared. A total volume of 20 μL of this solution was added in one aliquot to a mixture of 1860 μL of buffer and 120 μL of DMSO, in a 1.00 cm pathlength cuvette, to prepare a 0.06 mM solution. From this 0.06 mM solution two additional diluted solutions were prepared, 0.04 mM and 0.02 mM. A further 16.7 μL of the same DMSO stock solution (6.00 mM) was added in one aliquot to a mixture of 1860 μL buffer and 123.3 μL DMSO, in a 1.00 cm cuvette, to prepare a 0.05 mM solution. From this solution (0.05 mM), two further dilutions were prepared, 0.03 mM and 0.01 mM. Ligand absorbance at λ_{max} 302 nm was plotted against ligand concentration and a linear fit (red line) was applied to obtain the extinction coefficient of $(23.5 \pm 0.7) \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



A stock solution of **4** (6.00 mM) in DMSO was prepared. A total volume of 20 μL of this solution was added in one aliquot to a mixture of 1860 μL of buffer and 120 μL of DMSO, in a 1.00 cm pathlength cuvette, to prepare a 0.06 mM solution. From this 0.06 mM solution two additional diluted solutions were prepared, 0.04 mM and 0.02 mM. A further 16.7 μL of the same DMSO stock solution (6.00 mM) was added in one aliquot to a mixture of 1860 μL buffer and 123.3 μL DMSO, in a 1.00 cm cuvette, to prepare a 0.05 mM solution. From this solution (0.05 mM), two further dilutions were prepared, 0.03 mM and 0.01 mM. Ligand absorbance at λ_{max} 302 nm was plotted against ligand concentration and a linear fit (red line) was applied to obtain the extinction coefficient of $(28.9 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



DNA solutions

Fish sperm DNA was procured from Acros and calf thymus DNA was obtained from Sigma-Aldrich as a lyophilized solid sodium salt. Poly(dA-dT)₂ was purchased from Sigma-Aldrich as a lyophilized solid sodium salt. Fish sperm DNA and Poly(dA-

dT)₂ solutions were prepared by dissolution in phosphate buffer. All DNA solutions were dialysed extensively against buffer using a 3.5 kDa MW cut-off dialysis membrane. DNA concentrations were determined spectrophotometrically using $\epsilon_{260\text{nm}} = 12800 \text{ M (bp)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for fish sperm DNA and $\epsilon_{260\text{nm}} = 13200 \text{ M(bp)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for Poly(dA-dT)₂. Purity of DNA solutions was checked by UV-visible spectroscopy from the ratio $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$, which was found to be 1.96-1.92 for Poly(dA-dT)₂ and 1.89 for fish sperm DNA, suggesting that both solutions are essentially free of protein.

Interaction studies

Calorimetric binding experiments were carried out at 25 °C on a Microcal VP ITC microcalorimeter. The instrument was used in high-gain mode, applying a reference power of 10 $\mu\text{cal s}^{-1}$ while stirring the sample cell contents at 307 rpm. Titrations were carried out using different concentrations of FS-DNA (typically in the range of 3.5-7.2 mM) or Poly(dA-dT)₂ (typically in the range of 1.9 mM). The sample cell was filled with a known volume (approximately 1.9 mL) of a solution containing cationic glyco-oligoamide. For each experiment, the syringe was loaded with a concentrated DNA solution (when possible 12 fold higher than the ligand concentration, for Poly(dA-dT)₂ that excess was never reached). All titrations were carried out in two or three stages by refilling the syringe with the DNA ligand concentration, without mixing the contents of the calorimeter cell. This results in small jumps between subdatasets. For each stage of the titration, the DNA solution was added in 21 injections of 10 μL and 20 μL alternatively, every 300 seconds, at 25 °C. Data were treated in Origin (Microcal, Inc) to calculate heat effects per injection (ΔH). These integrated heat effects were analyzed using IC ITC.

5. **CAPÍTULO 5**

PROCESOS DE AGREGACIÓN SUPRAMOLECULAR DE GLICO- OLIGOAMIDAS CATIÓNICAS EN AGUA

5.1 Introducción

El autoensamblaje supramolecular (del inglés “self-assembly”) se puede definir como la creación espontánea y autónoma de agregados supramoleculares bien definidos, formados mediante el reconocimiento dirigido y reversible de un número de componentes (building blocks) por control de interacciones no covalentes.¹ Puesto que este proceso de autoensamblaje viene gobernado por la presencia de fuerzas reversibles, la formación del agregado es un equilibrio dinámico en el que variaciones en la concentración de monómero o en la temperatura, puede producir cambios importantes en la formación del agregado supramolecular y, como consecuencia, en su morfología y tamaño.² La unión no covalente de unidades fundamentales da lugar a agregados supramoleculares con distintas morfologías. Así, cuando se trabaja en régimen diluido se pueden obtener: vesículas, micelas esféricas, micelas cilíndricas o vesículas porosas entre otras estructuras.³

La mayoría de moléculas diseñadas para unirse al ADN, poseen unas características estructurales determinadas, orientadas al reconocimiento supramolecular de dicha macromolécula. Suelen ser moléculas aromáticas planas, para poder generar interacciones de tipo π - π , interacciones hidrófobas y de Van der Waals, o además, poseen en su estructura centros dadores de enlace de hidrógeno para poder interaccionar con los aceptores del ADN. Como se puede observar, los principios y fuerzas que gobiernan sobre el reconocimiento molecular del ADN, son muy similares a los involucrados en el campo de la química supramolecular.⁴ Por lo tanto, al mismo tiempo que estas características estructurales hacen que estas moléculas sean buenos ligandos del ADN, también facilitan su agregación en medio acuoso. Muchos de los ligandos más conocidos del ADN, tanto intercalantes como ligandos del surco menor, muestran agregación en agua. Como ejemplos de intercalantes destacan: el bromuro de etidio,⁵ naranja de acridina⁶ o las camptotecinas.⁷ Entre los ligandos del surco menor cuya agregación ha sido descrita en agua se encuentran: Hoechst 33258,⁸ la daunomicina,⁹ su análogo doxorubicina¹⁰ y el azul de metileno.¹¹

A pesar de que las oligoamidas heteroaromáticas han sido objeto de un amplio desarrollo como ligandos del surco menor del ADN, no son una excepción en cuanto la formación de agregados se refiere. Sin embargo, no ha sido hasta el año 2012 cuando

¹ Steed, J. W.; Atwood J. L. *Supramolecular Chemistry*; John Wiley and Sons: New York, NY, USA, 2000.

² Whitesides, G. M.; Grzybowski, B. *Science* **2002**, 295, 2418-2421.

³ (a) Lim, Y.-B.; Moon, K.-S.; Lee, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 925-934. (b) Zhang, X.; Wang, C. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 94-101.

⁴ Hannon, M. J. *Chem Soc. Rev.* **2007**, 36, 280-295.

⁵ Davies, D. B.; Djimant, L. N.; Veselkov, A. N. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1996**, 92, 383-390.

⁶ Veselkov, A. N.; Djimant, L. N.; Karawajew, L. S.; Kulikov, E. L. *Stud. Biophys.* **1985**, 106, 171-180.

⁷ Mazzini, S.; Bellucci, M. C.; Dallavalle, S.; Fraternali, F.; Mondelli, R. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 505-513.

⁸ Busto, N.; Cano, B.; Tejido, R.; Biver, T.; Leal, J. M.; Venturini, M.; Secco, F.; García, B J. *Phys. Chem. B*, **2015**, 119, 4575-4581.

⁹ Chaires, J. B.; Dattagupta, N.; Crothers, D. M., *Biochemistry* **1982**, 21, 3927-3932.

¹⁰ Hayakawa, E.; Furuya, K.; Ueno, H.; Kuroda, T.; Moriyama, M.; Kondo, A., *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, 39, 1009-1012.

¹¹ Braswell, E. H., *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 3653-3658.

Dervan ha descrito por primera vez, su tendencia a la agregación en disolución acuosa.¹² En ese estudio, se investigó la tendencia a la agregación de las oligoamidas constituidas por ocho anillos aromáticos y se intentó relacionar las distintas características estructurales de las moléculas con el tamaño de agregado. Cabe destacar, que se encuentran tamaños de agregado relativamente grandes (300-70 nm) a concentraciones muy bajas de oligoamida (1-4 μM), lo cual indica que hay una elevada tendencia de estas moléculas al autoensamblaje. A pesar de no haber sido descrita la agregación de oligoamidas de menor tamaño, si hay menciones en la bibliografía a la posible existencia de este tipo de procesos en disolución acuosa con oligoamidas más pequeñas.¹³ En la bibliografía, también se encuentran ejemplos de compuestos estructuralmente similares a las oligoamidas, aunque de menor tamaño, como las tiazotropinas y sus derivados. Es este estudio, la agregación en disolución acuosa de estos compuestos se estudia con más detalle y se relaciona a su vez, con el reconocimiento molecular del surco menor del ADN.¹⁴

El principal problema del autoensamblaje de ligandos del ADN, es que este proceso compite directamente con la unión del propio ligando a la macromolécula. Sin embargo, a pesar de que la mayoría de estas moléculas tienen tendencia a la agregación, no se encuentra mucha información sobre estos procesos de formación y caracterización de agregados supramoleculares constituidos por ligandos del ADN. El entendimiento de los factores y fuerzas, que afectan y gobiernan estos procesos de autoensamblaje puede ser crucial a la hora de diseñar y controlar las distintas propiedades de nuevos ligandos del ADN.

En el caso particular de las glico-oligoamidas catiónicas, como ya se ha mencionado en el capítulo anterior, los primeros indicios de la existencia de un proceso de agregación, se encontraron durante la realización de los experimentos de ITC. En concreto, la observación de una liberación lenta calor inespecífico durante la dilución de las glico-oligoamidas catiónicas fue el punto inicial del descubrimiento de la presencia de agregados en disolución acuosa. Paradójicamente, en el transcurso de los estudios por RMN de las glico-oligoamidas, tanto conformacionales como de interacción con ADN, nunca se encontraron signos de agregación en los espectros, tales como, ensanchamiento de señales de RMN o baja resolución de las mismas. Además, previo a los estudios de interacción con ADN, siempre se realiza un experimento de dilución por RMN, precisamente con objeto de descartar la posible influencia de un proceso de autoensamblaje en los resultados conformacionales de RMN. Estos experimentos de dilución nunca han mostrado unos desplazamientos químicos inducidos significativos (≤ 0.036), por el efecto de la concentración de la muestra, que hicieran sospechar de la presencia de agregados en agua.

¹² Hargrove, A. E.; Raskatov, J. A.; Meier, J. L.; Montgomery, D. C.; Dervan, P. B. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5425-5432.

¹³ Wang, S.; Kumar, A.; Aston, K.; Nguyen, B.; Bashkin, J. K.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 8543-8545.

¹⁴ M.-V. Salvia, F. Addison, H. Y. Alniss, N. J. Buurma, A. I. Khalaf, S. P. MacKay, N. G. Anthony, C. J. Suckling, M. P. Evstigneev, A. A. Hernandez Santiago, R. D. Waigh, J. A. Parkinson, *Biophys. Chem.* **2013**, *179*, 1-11.

Por este motivo, se decidió estudiar la agregación de las glico-oligoamidas catiónicas en medio acuoso, usando una serie de técnicas complementarias para la caracterización de agregados: experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*), experimentos de difusión por RMN (DOSY, *Diffusión Optimized Spectroscopy*), microscopía de fuerza atómica (AFM, *Atomic Force Spectroscopy*) y microscopía de transmisión electrónica de barrido (SEM, *Scanning Transmission Electron Microscope*). Los experimentos de caracterización de agregados mediante DLS, AFM y SEM se han realizado en colaboración con el Dr. Juan Rodríguez del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP).

5.2 Experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz (DLS) también llamada espectroscopía de correlación de fotones, es una técnica empleada para medir el movimiento browniano y su relación con la distribución de tamaños de partículas en disolución. Un haz láser ilumina la muestra y se analizan las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada. Las partículas en disolución están en constante movimiento, el llamado movimiento browniano. Este tipo de movimiento se produce cuando las partículas en suspensión colisionan aleatoriamente con las moléculas de disolvente que las rodean. La velocidad del movimiento browniano, depende de tres factores: la viscosidad, la temperatura y el tamaño de las partículas. Una consecuencia importante de este hecho, para la técnica de DLS, es que las partículas de menor tamaño se mueven a más velocidad y las partículas más grandes más lentamente. Si se asume la hipótesis que las partículas son esféricas, se puede relacionar el tamaño de partícula y su velocidad, debida al movimiento browniano mediante la ecuación de Stokes-Einstein.¹⁵

$$D = \frac{K_b T}{6\pi\eta R_h}$$

Donde D , es la constante de difusión, K_b , la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta del fluido, η la viscosidad del fluido y R_h el radio hidrodinámico de la partícula. Este último, se define como el radio de una esfera sólida, que difunde a la misma velocidad que la partícula o molécula estudiada. El radio hidrodinámico, no solo depende del núcleo de la partícula, sino también de su superficie y de la concentración y tipo de iones que haya en disolución. Las medidas de DLS proporcionarían el diámetro de una esfera, que será obtenido a través de una media de los coeficientes de difusión translacional de la partícula estudiada.

Las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada, varían por lo tanto, en función del tamaño de partícula. Las partículas de menor tamaño provocan que la intensidad fluctúe más rápido que las partículas grandes (Figura 5.1).

¹⁵ (a) Clark, N.; Lunacek, J.; Benedek, G.A. *American Journal of Physics* **1970**, 38, 575–585. (b) *Dynamic Light Scattering*; Pecora R. Eds.; Springer US, Plenum Press: New York, USA, 1985.

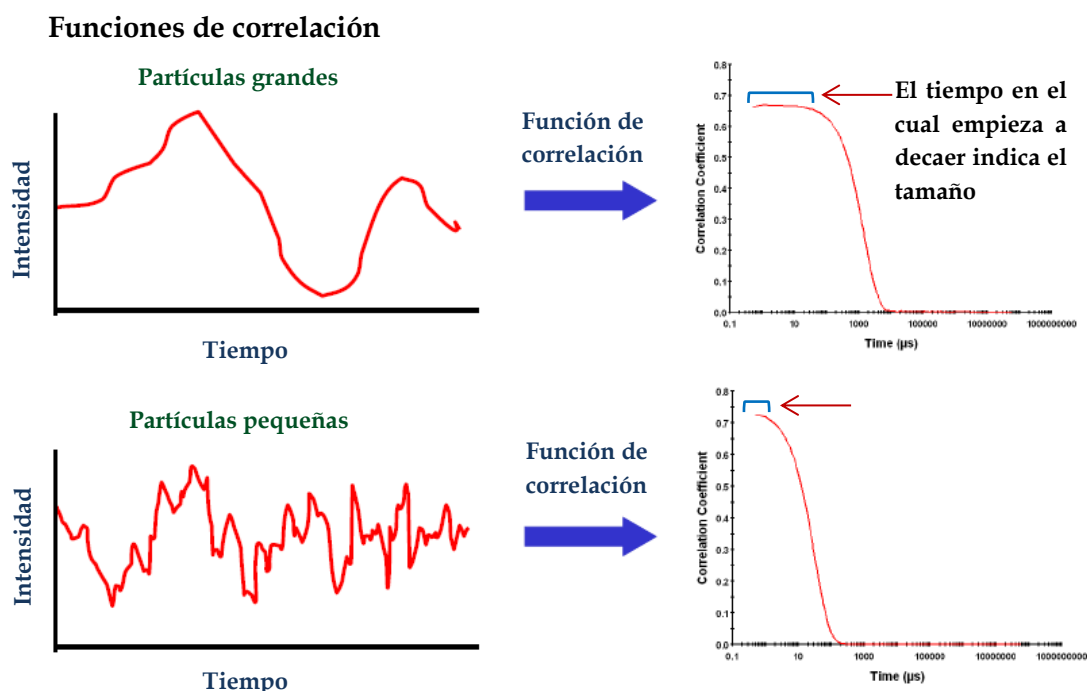


Figura 5.1 Fluctuaciones de la intensidad en función del tamaño de partícula y sus correspondientes funciones de correlación. (Imagen modificada de Malvern Instruments and ATA scientific. *Dynamic Light Scattering training*)

Con la monitorización de estas fluctuaciones de intensidad de luz dispersada con respecto del tiempo, y su análisis mediante una función de correlación, se obtienen diferentes curvas de correlación para cada tipo de partícula (Figura 5.1). Para partículas de mayor tamaño, cuya intensidad fluctúa más lentamente, la correlación de la señal tarda más en decaer. Sucede al contrario en partículas de menor tamaño, las fluctuaciones son más rápidas y su correlación decae más rápido. Esta función de correlación se ajusta mediante un algoritmo y se obtiene el correspondiente coeficiente de difusión de la partícula, que posteriormente se introduce en la ecuación de Stokes-Einstein para obtener el radio hidrodinámico.

El resultado más directo de las medidas de DLS, es la distribución en intensidad del tamaño de partícula. Por esta razón, una de las limitaciones de esta técnica, es que en las medidas siempre hay una mayor contribución de las partículas de mayor tamaño, a la distribución de tamaños final obtenida. Esto se debe precisamente a que se basa en la intensidad con la que las partículas en disolución dispersan la luz, y de acuerdo con la aproximación de Rayleigh, las moléculas de mayor tamaño dispersan más luz que las de menor tamaño (la intensidad de dispersión de una partícula es proporcional a la sexta potencia de su diámetro). Por lo tanto, la distribución de tamaños por intensidad está dominada por la contribución de los agregados de mayor tamaño, infravalorando la existencia de agregados de menor tamaño o monómero en disolución.

Los experimentos de DLS, se plantearon en primera instancia, con la idea de confirmar la existencia de agregados supramoleculares en disolución acuosa, en el rango de concentraciones empleado para los experimentos de interacción con ADN en ITC y RMN (100-800 μM). Posteriormente, se decidió ampliar el estudio para obtener información sobre la posible influencia de las condiciones de la disolución sobre la estabilidad y tamaño de los agregados tales como: el tampón usado en los experimentos de interacción, el empleo de un codisolvente en los experimentos, la influencia del pH y el efecto de la variación de la concentración de glico-oligoamida catiónica. El objetivo del estudio era lograr comprender el proceso de interacción y si fuera posible, encontrar las condiciones adecuadas para minimizarlo.

5.2.1 Efecto de la concentración y monitorización de la formación de los agregados

En primer lugar, a la vista de los problemas experimentales encontrados por ITC, se decidió comprobar la existencia de los agregados en condiciones similares a las empleadas en esa técnica y en RMN. Para ello, se realizaron medidas iniciales de DLS a tres concentraciones distintas. Además, debido a que los experimentos de ITC sugerían la existencia de un proceso lento en disolución, se decidió monitorizar la evolución en el tiempo de estas tres disoluciones.

Como primera aproximación, se realizaron medidas con disoluciones acuosas de la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2** en tampón fosfato (pH = 7.2), a tres concentraciones diferentes: 700 μM , 350 μM y 100 μM . Las medidas se realizaron inmediatamente después de preparar de manera independiente las disoluciones de glico-oligoamida catiónica. Para cada disolución se programaron seis medidas consecutivas rápidas de 30 s cada una para obtener buenas funciones de correlación.

Como se observa en la Figura 5.2, todas las muestras en el rango de concentraciones estudiadas presentan distribuciones de tamaños grandes (entre 100 nm hasta 1 micra), correspondientes a la existencia de agregados. Además, se aprecia un alto grado de polidispersidad en el tamaño de los agregados formados, por lo que se deduce que los agregados no son regulares y de un tamaño bien definido. El perfil obtenido para las concentraciones de 350 μM y 700 μM , es similar. Se obtiene una distribución de tamaños desde los 100 nm hasta valores superiores a 1 micra. Sin embargo, para la muestra más diluida (100 μM), al mismo tiempo que se observa una distribución de tamaños en la escala de 1 micra, también se observa la aparición de una población con en torno a 1 nm. Esto puede ser indicativo de la coexistencia tanto de agregados de elevado peso molecular como de moléculas monoméricas de glico-oligoamida catiónica.

Como ya se ha comentado, la distribución de tamaños en intensidad está dominada por una mayor contribución de las partículas de mayor tamaño, infravalorando la contribución de las más pequeñas. Por este motivo, en determinadas ocasiones es más conveniente expresar de otra manera los datos de DLS. A partir de la distribución en intensidad, los resultados de DLS pueden ser expresados en términos de número o volumen aplicando la teoría de Mie. La distribución de tamaños en

número expresa cuanto dispersa la luz una partícula con un diámetro concreto, permitiendo observar una distribución que no está más influenciada por las partículas de tamaños mayores. Sin embargo, se debe tener en cuenta, que la transformación de intensidad a número asume la usencia de error alguno en la medida de la intensidad, lo cual no es real. Por ello, este tipo de medidas es conveniente emplearlas en estudios comparativos. Para el caso de la disolución más diluida (100 μM), el análisis en número muestra una única señal con un máximo a 0.65 nm, que corroboraría la existencia mayoritaria de monómero en disolución (Figura 5.2).

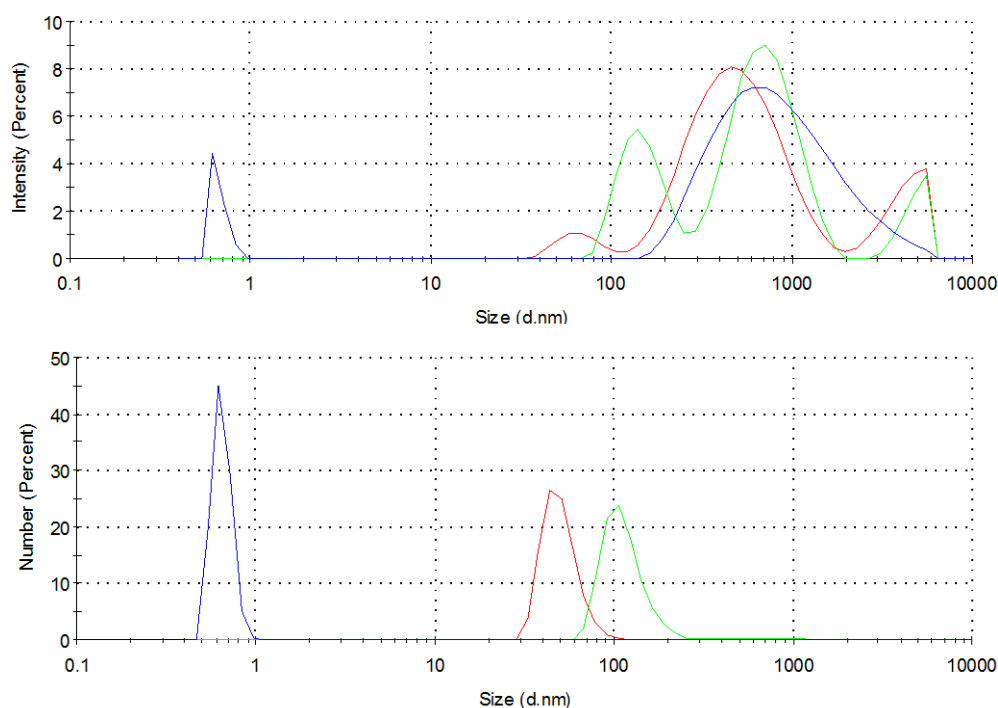


Figura 5.2 Arriba: Distribución de tamaños por intensidad, obtenida por DLS, de las distintas disoluciones de β -D-xil-Py- γ 3(R)NH₃⁺-Py-Ind (2): 700 μM (rojo), 350 μM (verde) y 100 μM (azul). Abajo: Distribución de tamaños en número, obtenida por DLS, de las distintas disoluciones de β -D-xil-Py- γ 3(R)NH₃⁺-Py-Ind (2): 700 μM (rojo), 350 μM (verde) y 100 μM (azul).

Además de la disminución de tamaño en número, en las curvas de correlación, se aprecia una pérdida de intensidad y un aumento de ruido. A pesar de que esto puede ser provocado por la disminución de la concentración, este cambio en las curvas, también podría ir asociado, al menos parcialmente, a la existencia mayoritaria de monómero en disolución mencionado anteriormente (Figura 5.3).

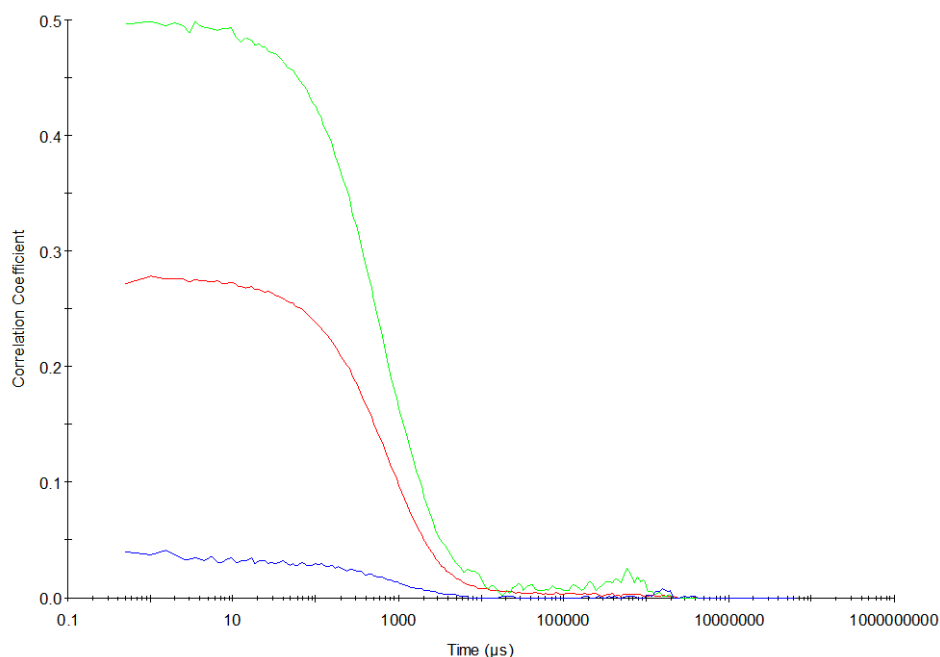


Figura 5.3 Funciones de correlación de la intensidad de luz dispersada en función del tiempo de las distintas disoluciones de β -D-xil-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2): 700 μ M (rojo), 350 μ M (verde) y 100 μ M (azul).

En estas medidas iniciales de la disolución más diluida, se observó una evolución del agregado dentro del mismo conjunto de seis medidas consecutivas realizadas. Los resultados variaban para cada una de las medidas, indicando, que además del factor estadístico de la medida, probablemente el proceso no había alcanzado un equilibrio. Por este motivo, se decidió monitorizar la evolución en el tiempo de las muestras, comenzando por las dos disoluciones más concentradas (700 μ M y 350 μ M).

Tanto en el caso de la disolución más concentrada (700 μ M), como en la de 350 μ M, no se encuentran cambios muy significativos en el transcurso de dos horas. Las muestras presentan una elevada polidispersidad en la distribución de tamaños. Aparecen distintas poblaciones, una de ellas con tamaños alrededor de 100 nm, otra con tamaños de agregado de varios cientos de nanómetros y otra de varias micras (Figura 5.4). De nuevo el análisis de tamaño en intensidad infravalora la existencia de los agregados de menor tamaño, debido a la aproximación de Rayleigh. Si se analizan estas distribuciones de tamaño en número, en vez de en intensidad, se observa que el sistema tiende a estabilizarse después de una hora y media, en torno a una distribución de tamaños con un máximo en 80 nm (Figura 5.4). Probablemente la población mayoritaria es la que se sitúa a 100 nm, la segunda posiblemente sean agregados de agregados, y la última, al límite de la técnica, entorno a 6 micras, sea contaminación de la muestra.

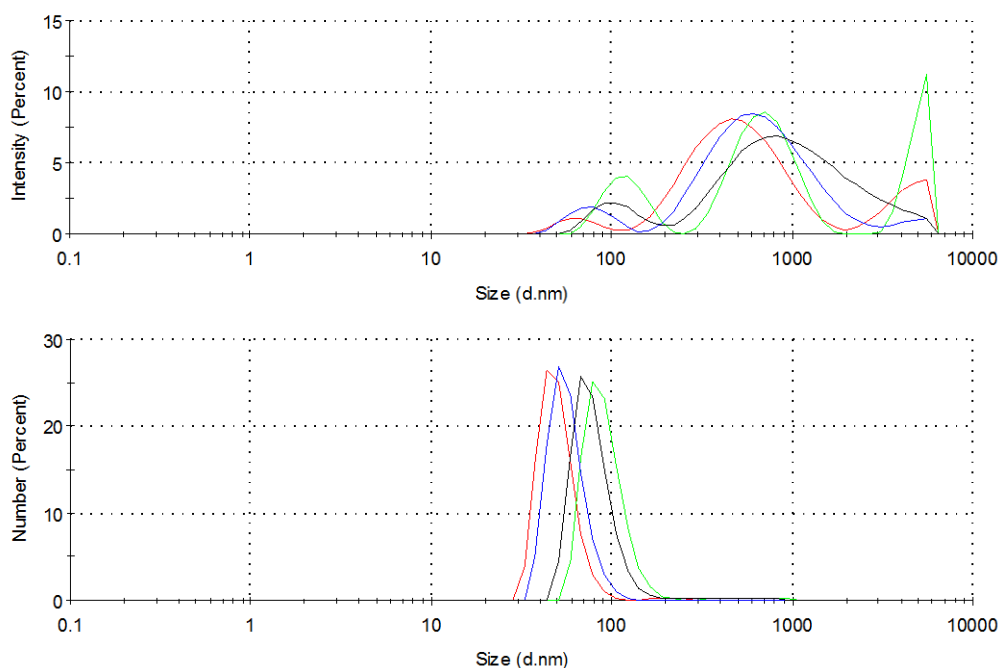


Figura 5.4 Distribución de tamaños por intensidad (arriba) y en número (abajo), obtenida por DLS, de la disolución de β -D-xil-Py- γ 3(R) NH_3^+]-Py-Ind (2), 700 μM a distintos tiempos: $t = 0$ (rojo), $t = 30$ min (verde), $t = 1$ h (azul), $t = 30$ min (negro).

Curiosamente, en el caso de la disolución de 100 μM , dentro de cada conjunto de medidas consecutivas, se obtiene una distribución de tamaños pequeños que se pueden asociar con el monómero, y también tamaños grandes que corresponderían a agregados de mayor tamaño, como los encontrados a otras concentraciones. Este hecho se reproduce en los distintos conjuntos de medidas a los diferentes tiempos, lo cual puede indicar una coexistencia de ambas especies en disolución (Figura 5.5). Las distribuciones en número muestran esta tendencia general de las medidas a distintos tiempos. Incluso pasadas tres horas, se observa variabilidad en la secuencia de medidas, apareciendo distribuciones que se asocian con la presencia de monómero y de agregado (Figura 5.6).

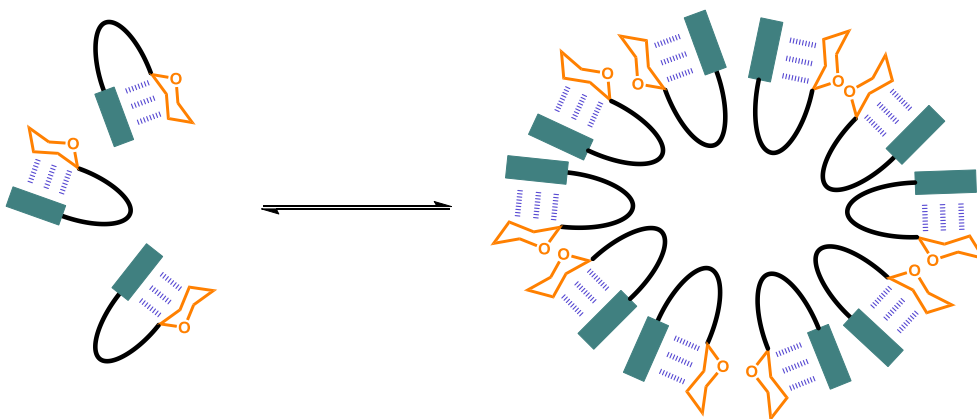


Figura 5.5 Esquema del equilibrio en disolución de las dos especies, monómeros y agregados

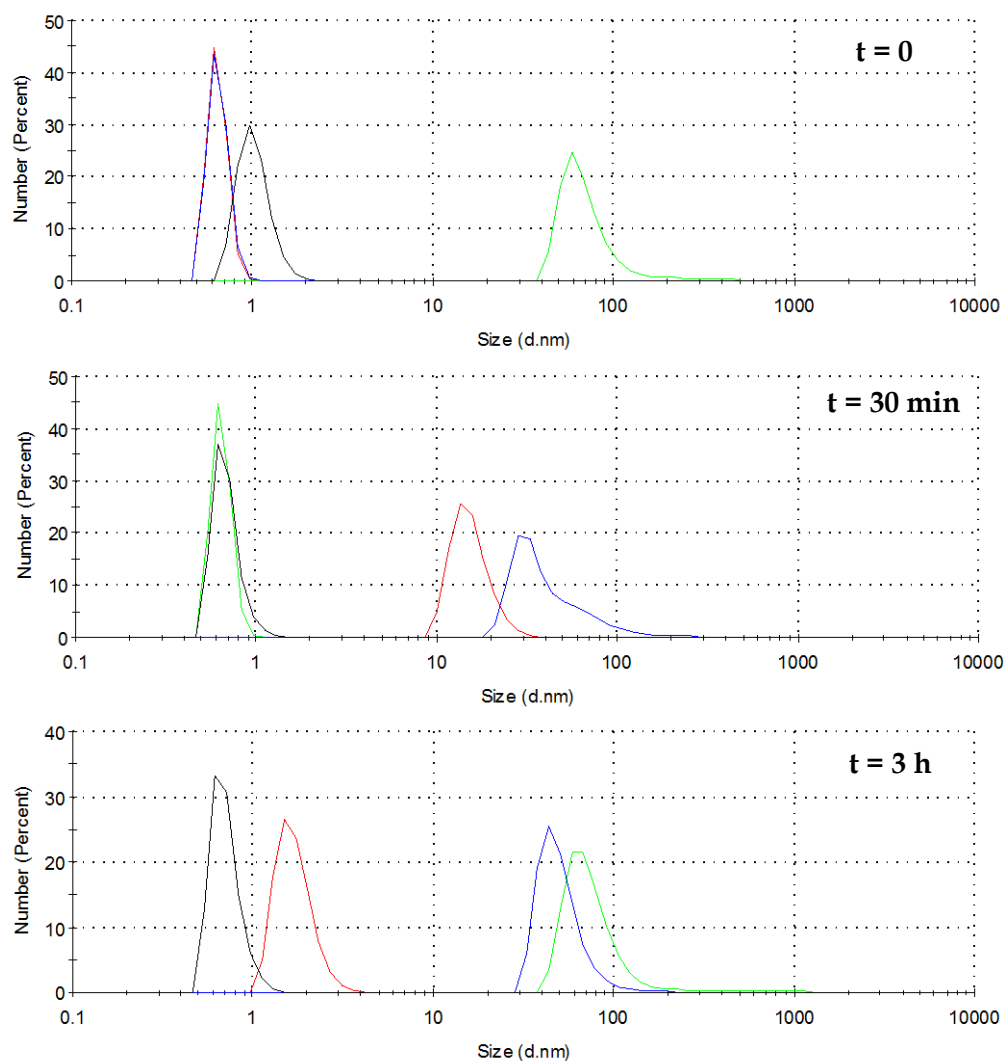


Figura 5.6 Distribución de tamaños en número, obtenida por DLS, de la disolución de β -D-xil-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2), 100 μ M, serie de medidas consecutivas a tiempo $t = 0$, $t = 30$ min y $t = 3$ h.

Cuando se dejan estabilizar los sistemas en disolución durante un día entero, y se repiten las medidas de DLS, para la disolución de 100 μ M, de nuevo se obtienen distribuciones de tamaños pequeñas, por debajo de 1 nm, en el límite de detección de la técnica. En cambio para las disoluciones más concentradas, se encuentran oscilaciones bastante acusadas en las distribuciones de tamaño en número, indicando una heterogeneidad de la muestra (Figura 5.7).

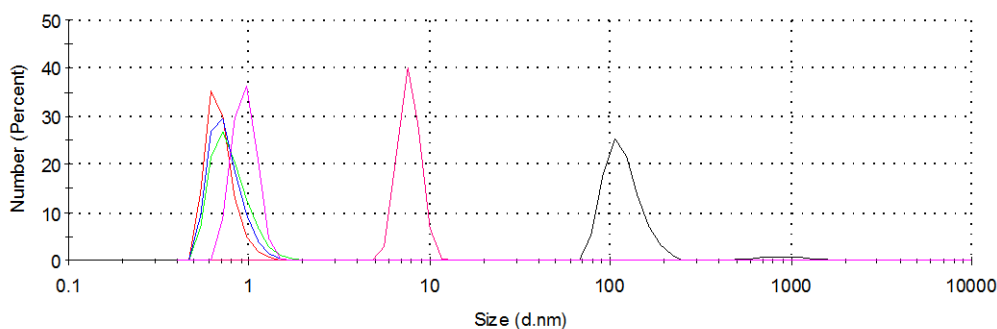


Figura 5.7 Distribución de tamaños en número, obtenida por DLS, de las disoluciones de β -D-xil-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2), 100 μ M (rojo, verde y azul) y 350 μ M (negro y rosa), serie de medidas consecutivas a tiempo $t = 24$ h.

Estos experimentos a distintas concentraciones monitorizadas a lo largo del tiempo, apuntan a la existencia de un equilibrio de formación y ruptura de agregados lento, puesto que el sistema sigue evolucionando transcurridas 24 h. Las medidas en todos los casos son muy polidispersas y revelan una gran heterogeneidad de tamaño de los sistemas. A concentraciones bajas (100 μ M), se observan distribuciones de tamaños mayoritarias que pueden ser atribuidas a la glico-oligoamida catiónica libre monomérica. Cuando se aumenta la concentración se obtienen distribuciones de tamaños mayores indicando la existencia de agregados grandes en un porcentaje mayor en disolución. Sin embargo, parece que estos sistemas derivan a lo largo de un tiempo de estabilización, hacia la coexistencia en disolución de agregados de mayor y de menor tamaño. Estos resultados están en concordancia con lo observado por ITC, apuntando también a la existencia de un cierto porcentaje de monómero en disolución.

5.2.2 Uso de DMSO como codisolvente y estudio de la influencia del tampón

Hasta el momento todas las medidas de DLS se habían realizado con disoluciones acuosas preparadas con tampón fosfato. Como se vió en el capítulo anterior, las condiciones empleadas en los experimentos de microcalorimetría (ITC), incluían un pequeño porcentaje de DMSO (7%) como codisolvente, por lo que se quiso estudiar su posible influencia en el proceso de agregación. Para ello se realizaron experimentos de concentración variable con las glico-oligoamidas catiónicas derivadas de D y L-manosa (3 y 4). Para obtener las disoluciones con distinta concentración, se preparó una disolución concentrada de glico-oligoamida catiónica, la cual se fue diluyendo para obtener el resto de disoluciones. De este modo, también se puede estudiar cómo afecta el proceso de dilución a los agregados una vez que ya se han formado.

En primer lugar cabe destacar, que las curvas correspondientes a las funciones de correlación mejoran notablemente con el uso del codisolvente y por tanto las distribuciones de tamaños de los agregados (Figura 5.8). La pendiente de las curvas de correlación es indicativa del grado de polidispersidad de la muestra. En este caso, la caída más vertical de las curvas de correlación hace pensar que en las medidas hay una menor polidispersidad comparando con las muestras que no llevan el DMSO.

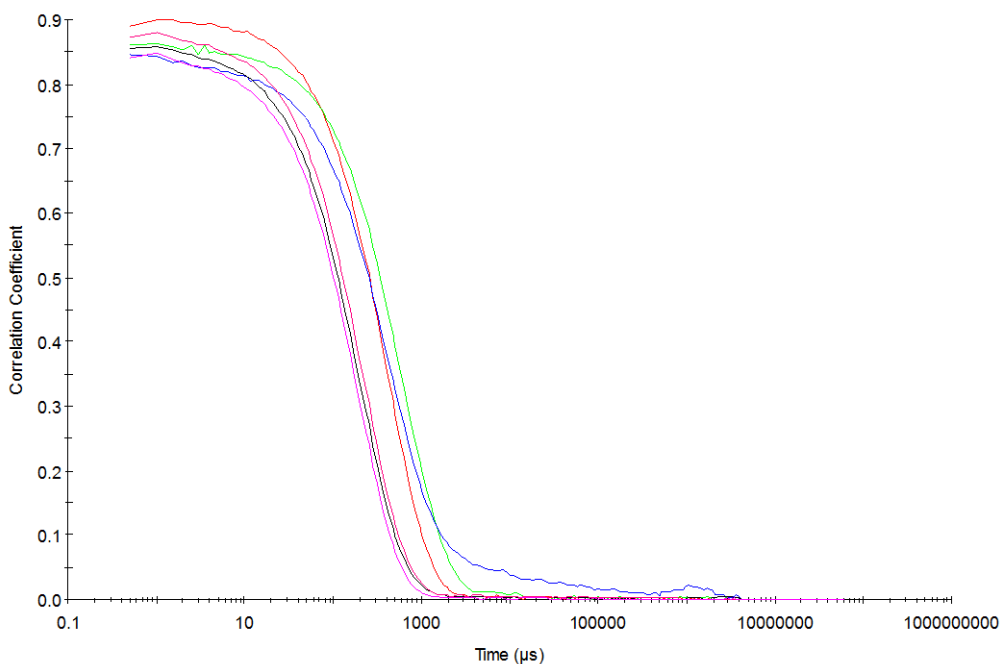


Figura 5.8 Funciones de correlación de la intensidad de luz dispersada en función del tiempo de las disoluciones de β -L-man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) a distintas concentraciones: 750 μ M (rojo), 375 μ M (verde), 250 μ M (rosa), 100 μ M (azul), 50 μ M (negro) y 25 μ M (rosa) .

En la siguiente Figura 5.9, se muestran las distribuciones de tamaños en intensidad obtenidas para la glico-oligoamida catiónica β -L-man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4). Se observa como a medida que se va diluyendo la muestra, el máximo de la distribución de tamaños en intensidad, se va desplazando a tamaños más pequeños. En este caso, a pesar de que la distribución de tamaños sea ancha, solo aparece una población. Los intervalos son de varios cientos de nanómetros, indicando que los agregados no presentan tamaños uniformes. El máximo de las distribuciones de tamaños, va desde los 330 nm y 420 para las disoluciones más concentradas hasta los 150 nm para las disoluciones más diluidas. A diferencia de lo que sucedía en las medidas del apartado anterior, en esta ocasión la dilución de la muestra desde 750 μ M hasta 25 μ M no conduce a la aparición de una señal correspondiente al monómero. Esto indica, que el cómo se preparen las disoluciones afecta a la formación de los agregados.

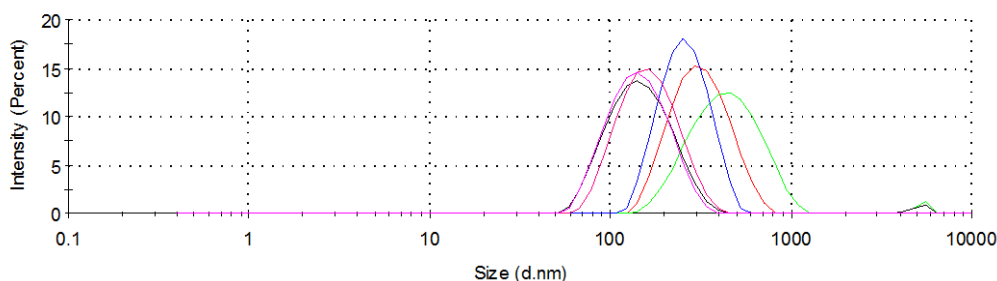


Figura 5.9 Distribución de tamaños por intensidad de las disoluciones de β -L-man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) en tampón fosfato con 7% de DMSO a distintas concentraciones: 750 μ M (rojo), 375 μ M (verde), 250 μ M (rosa), 100 μ M (azul), 50 μ M (negro) y 25 μ M (rosa) .

Cuando se realizan los mismos experimentos con el otro diastereómero β -D-man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**), se obtienen resultados similares, en donde el máximo de las distribuciones de tamaños se desplaza a tamaños más pequeños (Figura 5.10). A pesar de que la tendencia observada es similar, los tamaños encontrados a concentraciones más elevadas de este compuesto son menores (alrededor de 200 nm) que los obtenidos con el otro derivado de L-manosa (300-400 nm). Además, se observa una mayor homogeneidad de tamaños en esta muestra, y a medida que disminuye la concentración, la distribución de tamaños se ensancha. Aunque las medidas realizadas con la disolución de 10 μ M, se encuentran ya en el límite de detección, cabría la posibilidad de que la ruptura de los agregados, fuese responsable de este aumento de polidispersidad de la muestra.

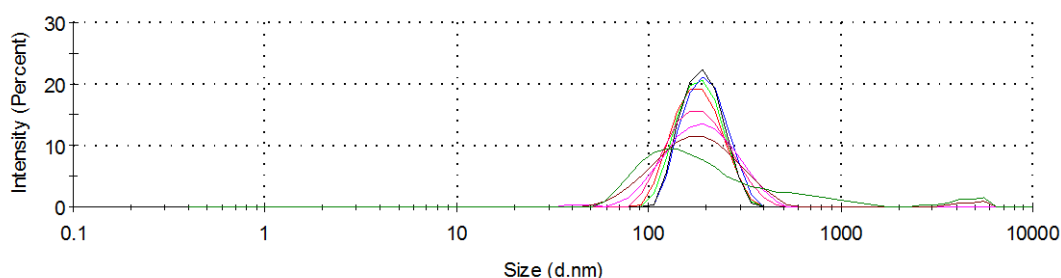


Figura 5.10 Distribución de tamaños por intensidad de las disoluciones de β -L-man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**) en tampón fosfato con 7% de DMSO a distintas concentraciones: 1000 μ M (rojo), 750 μ M (verde claro), 500 μ M (azul), 250 μ M (negro), 100 μ M (rosa), 50 μ M (rosa claro), 25 μ M (marrón) y 10 μ M (verde oscuro).

En estos experimentos, se han alcanzado concentraciones más bajas de glico-oligoamida catiónica, que en el apartado anterior, pero sin llegarse a observar distribuciones de tamaños que se puedan asociar a la molécula libre como monómero. Esto puede ser motivado, o bien por el efecto del 7% de codisolvente empleado o bien por la distinta preparación de las muestras, mediante dilución de una disolución madre. Esta hipótesis apuntaría a que una vez formados los agregados de gran tamaño, estos son lo suficientemente estables en esas condiciones como para no romperse fácil y rápidamente mediante la dilución de la muestra. Esto estaría en concordancia con lo observado por ITC, en donde el ligando agregado, al pasar de la jeringa de inyección a la celda se diluye y comienza el lento proceso de ruptura de agregado, que se traduce en una liberación lenta de calor.

Con intención de evaluar la posible influencia del tampón fosfato en el proceso de formación de agregados, e intentar evitar dicho proceso, se prepararon disoluciones de glico-oligoamida catiónica derivada de L-manosa (**4**), empleando como disolución tampón el ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS). Este tampón, con un pH en torno a 7, es comúnmente usado para experimentos de interacción con ADN y en diversos sistemas biológicos.

En primer lugar, se realizaron medidas con MOPS a pH= 7, sin añadir el 7% de DMSO como codisolvente. Sin embargo, se obtuvieron curvas de correlación que no decaían de manera sigmoidal y la polidispersidad de las medidas era muy elevada. Por

este motivo, se optó por hacer las medidas añadiendo el porcentaje correspondiente de DMSO. El experimento se llevó a cabo reproduciendo el modo de preparación y condiciones en las cuales se había realizado el experimento previo en tampón fosfato, es decir, preparando una disolución madre y realizando diluciones consecutivas.

Al igual que sucedía en el con las disoluciones de β -L-man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) en tampón fosfato, se observa una tendencia de disminución de tamaños de agregado y aumento de polidispersidad, a medida que baja la concentración (Figura 5.11). El máximo de la distribución de tamaños de desplaza desde 480 nm a una concentración de 750 μ M hasta 230 nm en el caso de disoluciones 25 μ M. Además, en la disolución más diluida, comienza a aparecer una población de agregados de menor tamaño, alrededor de 34 nm, indicando la ruptura de los agregados de mayor tamaño. Sin embargo, la disminución de tamaños no es tan pronunciada como con las disoluciones de tampón fosfato. Esto podría apuntar a una mayor estabilización de los agregados en tampón MOPS. Por lo tanto, ni el cambio de tampón, de fosfato a MOPS, ni el empleo de DMSO como disolvente, hacen variar sustancialmente el comportamiento de agregación de los derivados de D y L-manosa.

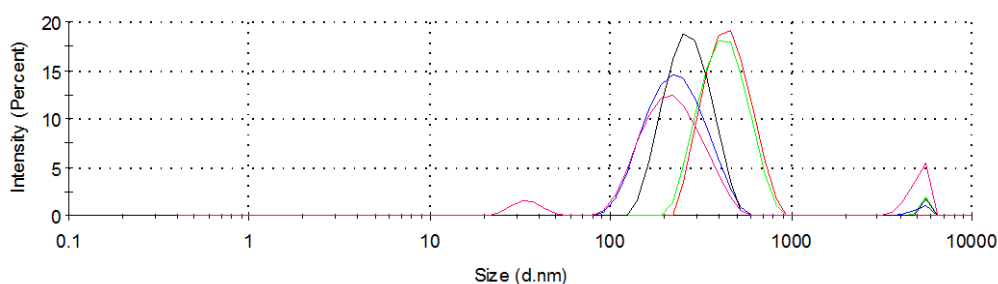


Figura 5.11 Distribución de tamaños por intensidad de las disoluciones de β -L-man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) en tampón MOPS con 7% de DMSO a distintas concentraciones: 750 μ M (rojo), 375 μ M (verde), 100 μ M (azul), 50 μ M (negro) y 25 μ M (rosa) .

Con objeto de lograr obtener más información sobre el proceso de agregación, se optó por realizar un experimento con disoluciones de glico-oligoamida catiónica a una concentración constante (250 μ M), pero variando el porcentaje de DMSO. Para preparar las disoluciones, se siguió el método empleado para la preparación de muestras de los experimentos de ITC. Es decir, se partió de una disolución madre de DMSO, y se prepararon las distintas disoluciones con los distintos porcentajes de DMSO y agua a partir de esa.

En primer lugar se midió una primera disolución de glico-oligoamida catiónica de D-manosa (3), disuelta en su totalidad en DMSO. A pesar de la concentración de compuesto empleada (250 μ M) no se obtuvo suficiente intensidad de señal dispersada como para obtener medidas de tamaños fiables. Esto puede ser porque en disolvente orgánico las glico-oligoamidas catiónicas se encuentran sin auto-asociar, en estado libre. Agregados de pequeño tamaño y en mayor medida moléculas individuales producen una señal muy débil. En este caso los tamaños de las moléculas son demasiado pequeños como para ser detectados por el detector de DLS. Sin embargo,

con la adición de tan solo un 1% de tampón fosfato, se comienzan a observar distintas poblaciones de agregados de tamaños por encima de 500 nm, cuando se realiza el análisis en función de la intensidad (Figura 5.12). Dentro de la serie de medidas consecutivas, se aprecia una variabilidad en el resultado, debido probablemente a que el sistema no está completamente estabilizado. Cuando se aumenta el porcentaje de tampón fosfato a un 5%, se produce un aumento del tamaño de agregado, llegando a estar el máximo de la distribución de tamaños cercano a la micra (Figura 5.13). Sorprendentemente, a partir de ese momento, a medida que el porcentaje de tampón fosfato aumenta (10%, 20%, 50%), se observa una disminución progresiva de tamaños de agregado, hasta aproximarse de nuevo a un tamaño de unos 600 nm. Con porcentajes más elevados de tampón fosfato, se observan distribuciones de tamaños más anchas, cuyos máximos se estabilizan entorno a 200 nm.

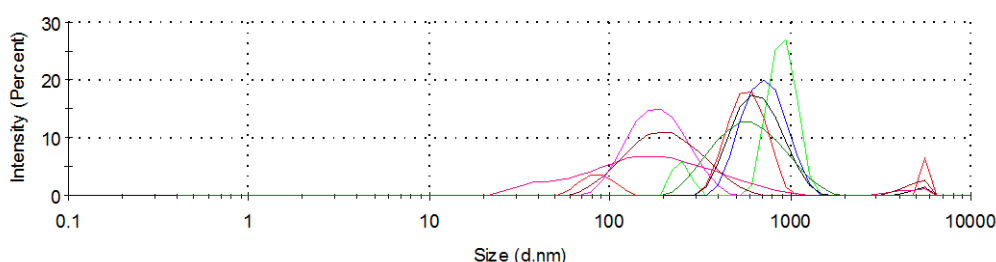


Figura 5.12 Distribución de tamaños por intensidad de las disoluciones de β -D-man-Py- γ 3(R) NH_3^+ -Py-Ind (3) $250\mu\text{M}$ en DMSO, con distintos porcentajes de tampón fosfato: 1% (rojo), 5% (verde), 10% (azul), 20% (negro), 50% (verde oscuro), 75% (rosa oscuro), 93% (rosa) y 100% (marrón).

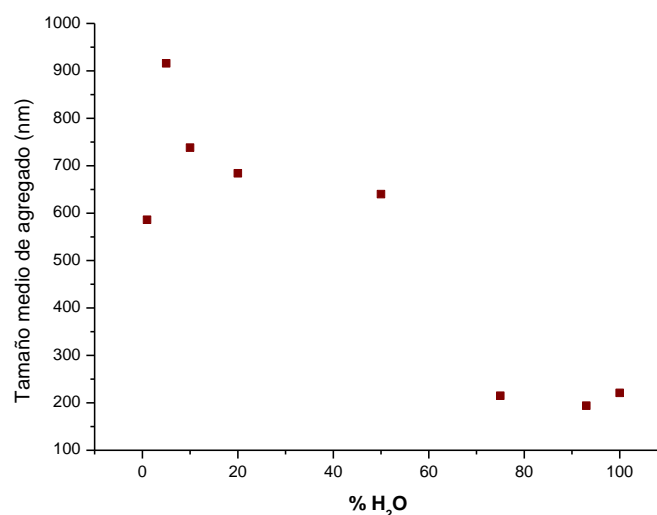


Figura 5.13 Gráfica de la variación del tamaño medio de agregado en función de la variación del porcentaje de agua en la disolución.

A la vista de estos resultados, se podría plantear un posible proceso de agregación promovido por la presencia de agua en el medio orgánico. En este proceso inicialmente, con porcentajes pequeños de tampón fosfato en el medio, se generaría una auto-asociación de las moléculas libres de glico-oligoamida catiónica, para dar agregados de gran tamaño, que evoluciona hacia agregados de menor tamaño a medida que el porcentaje de disolución acuosa aumenta. Dada la amplitud de las

distribuciones de tamaños, también cabe la posibilidad de que se formen cúmulos de agregados individuales (Figura 5.14).

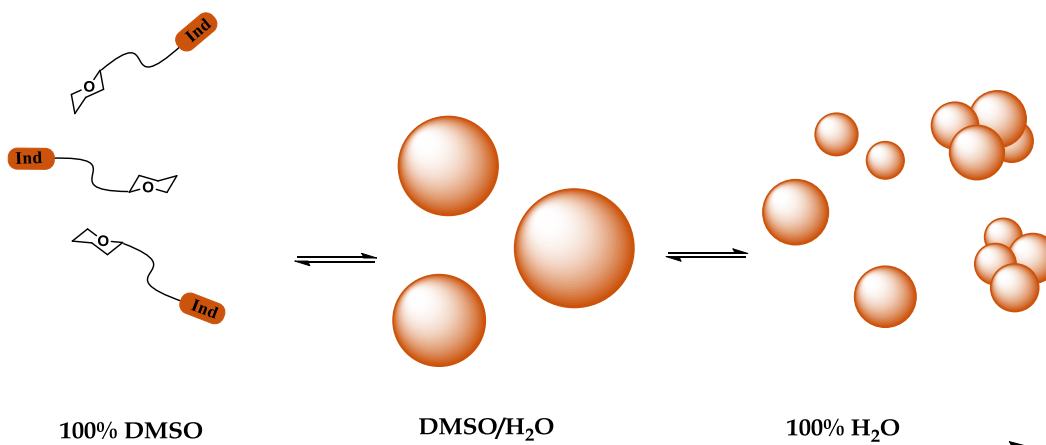


Figura 5.14 Representación esquemática del posible equilibrio de agregación

5.2.3 Agregación de los modelos hebra-carbohidrato (β -D-xil-Py-NHAc) y hebra-indol (Ind-Py-COOH)

Otro de los puntos importantes para comprender un poco mejor el proceso de autoensamblaje de las glico-oligoamidas catiónicas, es saber qué residuos tienen más influencia en la formación de los agregados. Dados los antecedentes encontrados en la bibliografía y las propiedades estructurales de los sistemas aromáticos, se puede presuponer que los pirroles y el indol sean probablemente los responsables de la agregación. No obstante, el carbohidrato también puede promover este tipo de procesos, generando redes cooperativas de enlace de hidrógeno mediante interacciones carbohidrato-carbohidrato, o indol-carbohidrato. Por ello, se quiso estudiar la posible influencia de cada una de las hebras en el proceso de agregación.

Las medidas se realizaron con disoluciones de modelos hebra-carbohidrato de xilosa β -D-xil-Py-NHAc (**5**) y hebra-indol Ind-Py-COOH (**11**), en tampón fosfato con un 7% de DMSO, a distintas concentraciones. Desafortunadamente, las medidas no fueron concluyentes, debido a que mostraron un alto grado de polidispersidad y curvas de correlación muy ruidosas. No obstante, las medidas del modelo hebra-carbohidrato parecen indicar la presencia de agregados a todas las concentraciones (Figura 5.15). Se encontraron distribuciones de tamaño muy anchas para todas las concentraciones, cubriendo un rango desde 50 nm hasta una micra. El análisis en número de los datos muestra como la población mayoritaria es la inferior a 100 nm (Figura 5.15).

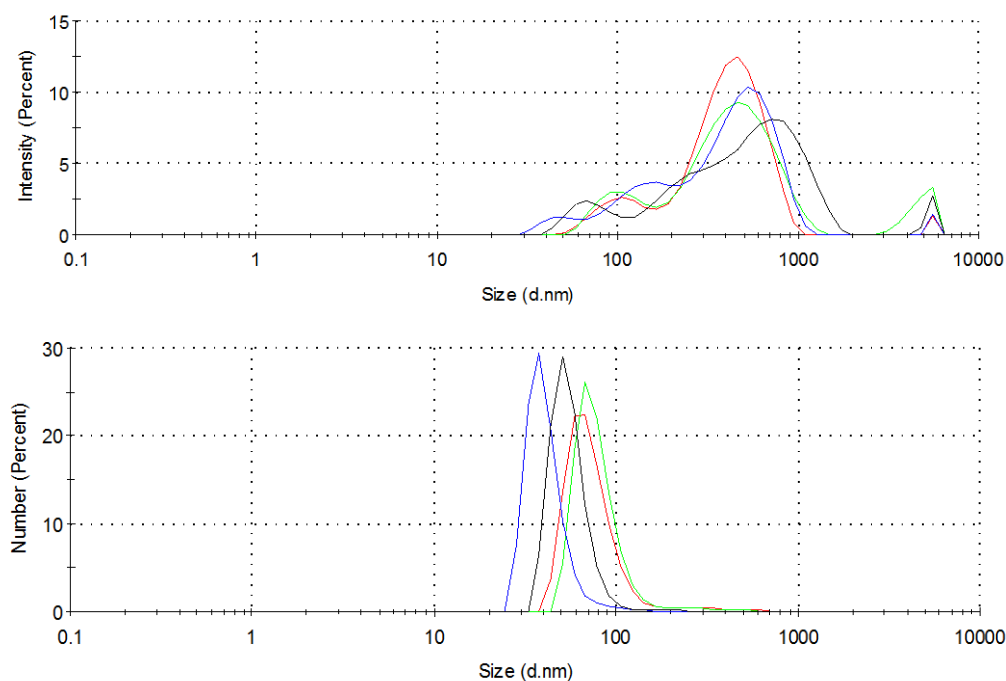


Figura 5.15 Distribución de tamaños por intensidad (arriba) y número (abajo) de las disoluciones de β -D-xil-Py-NHAc (5) en tampón fosfato con 7% de DMSO a distintas concentraciones: 1000 μ M (rojo), 500 μ M (verde), 100 μ M (azul) y 25 μ M (negro).

En el caso de la hebra indol, también se obtienen distribuciones de tamaños que se pueden asociar con agregados. Las distribuciones de tamaños son más estrechas a concentraciones altas y se ensanchan a concentraciones bajas, probablemente por la ruptura de los agregados por la dilución de la muestra.

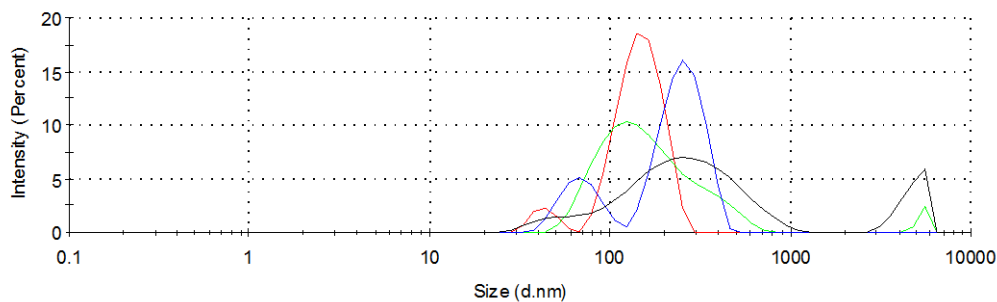


Figura 5.16 Distribución de tamaños por intensidad de las disoluciones de Ind-Py-COOH en tampón fosfato con 7% de DMSO a distintas concentraciones: 1000 μ M (rojo), 500 μ M (verde), 100 μ M (azul) y 25 μ M (negro).

Estas medidas parecen indicar, que ambos fragmentos de la glico-oligoamida catiónica son responsables de los procesos de agregación observados en disoluciones acuosas.

5.2.4 Efecto del pH de la disolución y medida del potencial Z

Con el objetivo de comprobar la estabilidad de estos sistemas de agregados, se decidió realizar un estudio de medida de potencial zeta en función del pH, y al mismo tiempo medir también el tamaño de partícula. Además, se quiso comprobar si también

existía algún proceso de auto-asociación en disolución acuosa con las glico-oligoamidas neutras. Si las glico-oligoamidas catiónicas tienden a autoensamblarse, a pesar de la carga positiva situada en el fragmento γ , probablemente las glico-oligoamidas neutras tengan también tendencia a la agregación.

Cuando una partícula cargada se suspende en una disolución, iones de carga opuesta a la superficial, son atraídos a la superficie de esta partícula. Mientras los iones más cercanos a la superficie de la partícula están fuertemente unidos a ésta, los iones más alejados están unidos más débilmente formando lo que se conoce como capa difusa. En esa capa, existe un límite hipotético donde cualquier ion dentro de ese límite se moverá con la partícula cuando ésta se mueva en el seno del líquido, pero cualquier ion que se encuentre por fuera de este límite se quedará donde se encontraba originariamente. Este límite se conoce como plano de deslizamiento. Existe un potencial entre la superficie de la partícula y el líquido dispersante, que varía de acuerdo con la distancia desde la superficie de la partícula. Este potencial en el plano de deslizamiento es lo que se denomina como potencial zeta (Figura 5.17).

Este potencial zeta se mide utilizando una combinación de dos técnicas: Electroforesis y Velocimetría Laser Doppler (Laser Doppler Velocimetry, LDV), denominada en algunos casos Electroforesis Laser Doppler (Laser Doppler Electrophoresis, LDE). Este método mide la velocidad del movimiento de una partícula en un líquido cuando se aplica un campo eléctrico sobre éste. Una vez que se conoce la velocidad de la partícula y el campo eléctrico aplicado podemos, usando otras dos constantes de la muestra como la viscosidad y la constante dieléctrica, obtener el potencial zeta de la misma.

El estudio y cálculo del potencial zeta de dispersiones coloidales es de gran interés, pues permite ayudar a conocer parámetros importantes como por ejemplo la tendencia a flocular de las partículas dispersas en un líquido. Así, el potencial zeta es un factor importante a la hora de determinar la estabilidad de los sistemas. Cuanto mayor es el potencial zeta en valor absoluto, las partículas en suspensión tenderán a repelerse y el sistema será más estable. Para valores bajos en valor absoluto de potencial zeta, habrá más tendencia de las partículas a flocular y o precipitar y más inestable será el sistema. En disolución acuosa, el factor que más afecta al potencial zeta de un sistema es el pH.

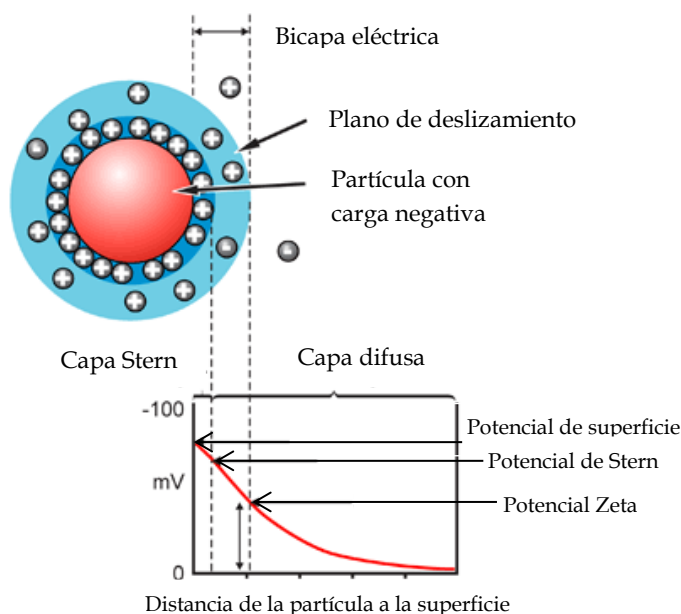


Figura 5.17 Representación esquemática del potencial zeta (Imagen modificada de Malvern Instruments Ltd. 2003-2004. Zetasizer Nanoseries User Manual. United Kingdom)

A continuación, se muestran estudios preliminares realizados con los derivados catiónico y neutro de xilosa (**1** y **2**) para evaluar la variación de los tamaños de partícula en función del pH y del potencial Z. Para realizar el estudio se prepararon dos disoluciones de los correspondientes derivados, neutro (**1**) y catiónico (**2**), de xilosa en agua con una concentración de 100 μM . Las medidas se realizaron a distinto pH, el cual fue regulado mediante la adición de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio. Estas medidas también se realizaron con una disolución del derivado catiónico a una concentración mayor, 350 μM . Los resultados muestran la misma tendencia que para la disolución menos concentrada, por lo que a continuación solo se muestran los de la disolución de 100 μM .

Para la glico-oligoamida catiónica, se encuentran potenciales zeta positivos no muy pronunciados (alrededor de +10 mV) a pH ácidos, por debajo de 4 (Figura 5.19). El punto isoeléctrico se alcanza a un pH cercano a 5. A partir de ese momento, los valores comienzan a ser negativos, hasta alcanzar un valor de -30 mV a un pH superior a 8. En general, el punto isoeléctrico donde el potencial zeta es cero, es el punto donde el sistema es menos estable. En este caso, parece que el sistema se estabiliza a medida que el pH se hace más básico. Si se presta atención a los datos de tamaño obtenidos, se observa que coincidiendo con el punto isoeléctrico del sistema se encuentra el tamaño más grande de agregado, cercano a la micra. Al no haber cargas, no hay repulsión electrostática, y los agregados tienden a flocular. A medida que el potencial zeta se hace más negativo y el pH aumenta, los tamaños de agregado disminuyen, llegando a estabilizarse entorno a los 100 nm. El que aparentemente, el sistema de agregados tienda a estabilizarse a pH 7 o superiores, es un inconveniente a la hora de realizar los experimentos de interacción con ADN, ya que el pH de trabajo de esos experimentos es de entorno a 7.3 por la estabilidad del ADN.

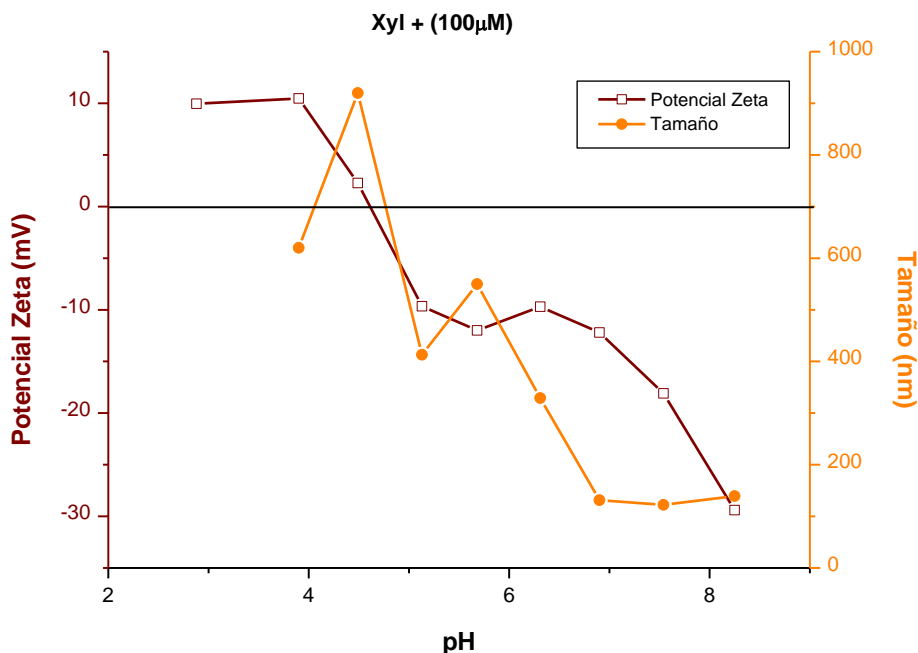


Figura 5.18 Gráfica de la variación del potencial zeta y del tamaño de agregado de la disolución acuosa de β -D-xil-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) en función del pH.

Los resultados para la glico-oligoamida neutra de xilosa son diferentes. Las medidas de potencial zeta muestran valores pequeños (entre +2 y -8) indicando la inestabilidad del sistema en un rango de pH entre 3 y 7 (Figura 5.19). Parece, que el sistema tiende a estabilizarse a pH más básicos. En cuanto a los tamaños, los valores obtenidos no son fiables, las curvas de correlación son muy ruidosas y no se cumplen los criterios de calidad. Los tamaños obtenidos de esas medidas, son muy inferiores a lo que cabría esperar. A nivel estructural los derivados neutros y catiónicos son muy similares, diferenciándose tan solo en la introducción de un grupo amino extra en el fragmento γ , en el caso de los catiónicos. Además la introducción de un grupo extra ionizable, no ayudaría a propiciar el proceso de agregación sino al contrario, debido a la repulsión electrostática. Esto lleva a pensar, que probablemente se formen agregados de mayor tamaño, que el detector no puede registrar. Si además se tienen en cuenta a los problemas de solubilidad, se puede concluir que las condiciones no son las idóneas para obtener buenas medidas. Por lo tanto, los valores que se muestran en la gráfica no son los reales. Con posterioridad a estas medidas, se realizó en el grupo un estudio más amplio del proceso de agregación de los derivados neutros, que confirmó la existencia de un proceso de auto-asociación del sistema muy parecido al encontrado con los derivados catiónicos.

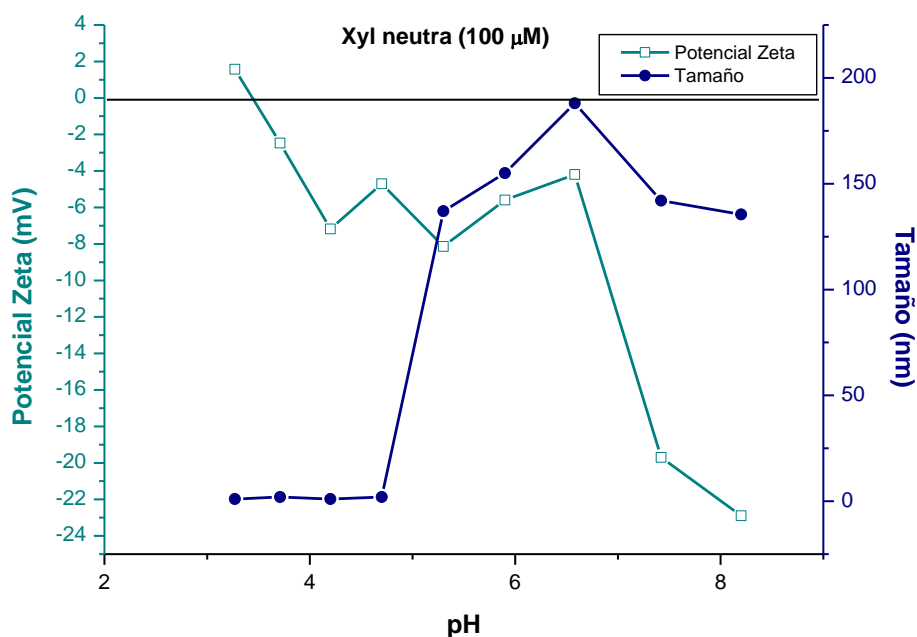


Figura 5.19 Gráfica de la variación del potencial zeta y del tamaño de agregado de la disolución acuosa de β -D-xil-Py- γ -Py-Ind (1) en función del pH.

La principal conclusión que se extrae de los estudios por DLS, es la existencia de un proceso de agregación en disolución acuosa de las glico-oligoamidas catiónicas y neutras. Se forman agregados supramoleculares de tamaños muy diversos que se ven afectados por la forma de preparación de las disoluciones y las condiciones de las mismas (concentración, tampón, %DMSO). Aparentemente, son lo suficientemente estables, como para no poder provocar su desaparición total por dilución de la muestra, aunque si disminuye su tamaño. Además el estudio preliminar de potencial Z podría sugerir que se estabilizan a pH 7 o superiores.

No obstante, los experimentos de DLS también parecen indicar que a algunas concentraciones existe también en disolución una proporción determinada de glico-oligoamida catiónica monomérica. Todos estos resultados, están en concordancia con lo observado en ITC. Precisamente, en ITC ha sido posible optimizar un método de valoraciones inversas, gracias a la existencia de suficiente monómero en disolución para unirse al ADN, sin que se necesiten la ruptura de agregados que liberen más monómero en disolución. En esta metodología, el ADN se adiciona sobre la celda que contiene la disolución de glico-oligoamida catiónica. Si no hubiera suficiente monómero libre para unirse al ADN que se va añadiendo, habrían aparecido señales correspondientes al proceso de ruptura de los agregados que hubiesen interferido en las medidas del proceso de agregación.

5.3 Microscopía de fuerza atómica

Una vez comprobada la capacidad de estas moléculas para autoensamblarse en disolución, se decidió evaluar si los agregados tenían una estructura supramolecular

organizada y bien definida. Para ello se recurrió a la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), con objeto de lograr alguna imagen que diese información sobre la morfología de los agregados.

El microscopio de fuerza atómica es un instrumento mecano-óptico que permite analizar la estructura de superficies a nivel atómico. El sistema emplea una punta de forma piramidal con un radio en el extremo más fino típicamente de entre 2 y 10 nm (Figura 5.20). La punta de medida está sujeta al escáner y se desplaza a lo largo de la superficie. En el modo más sencillo, modo “tapping” la punta oscila con una frecuencia determinada. De esta manera al desplazarse de izquierda a derecha, los cambios en altura de la muestra se traducen en variaciones de la frecuencia y estas en medidas de la topografía superficial. De este modo, mediante sucesivas medidas a lo largo de líneas paralelas se escanean y registran los cambios topográficos de una superficie.¹⁶ Esta técnica es muy versátil, que permite el análisis superficial de cualquier tipo de muestra con resolución nanométrica.

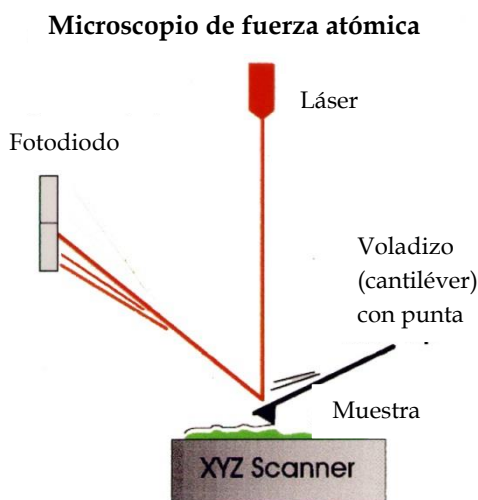


Figura 5.20 Representación esquemática del funcionamiento del microscopio de fuerza atómica (Imagen tomada de H. Greenwood Hansma, Departamento de Física, Universidad de California en Santa Barbara. <http://web.physics.ucsb.edu/~hhansma/biomolecules.htm>)

Se prepararon una serie de muestras de todas las glico-oligoamidas catiónicas, depositando una gota de una disolución diluida de compuesto sobre un soporte de vidrio o pulverizando la disolución sobre el soporte y dejando evaporar las microgotas depositadas. La preparación de las muestras no es trivial y resulta crítico para el éxito final del experimento. En este sentido el método de preparación de las muestras de las glico-oligoamidas necesita optimizarse. Por lo tanto, a pesar de que los experimentos se han realizado con todas las muestras de las diferentes glico-oligoamidas catiónicas, solo se han logrado imágenes de calidad con algunas de ellas.

En estos experimentos de AFM para la muestra del derivado de L-manosa (**4**), se observó que los agregados formados son de naturaleza circular, de tamaños bastante

¹⁶ (a) Magonov, S.; Yerina, N. In *Handbook of Microscopy for Nanotechnology*; Yao, N., Wang, Z., Eds.; Springer US: 2005, p 113. (b) Binnig, G.; Quate C. F.; Gerber, C. *Physical Review Letters* **1986**, 56, 930-933.

inferiores a los obtenidos por DLS probablemente debido a la evaporación del disolvente. Dentro de esta morfología circular, se observa un centro de la muestra más hundido que podría indicar la formación de agregados esféricos vesiculares huecos, que no son lo suficientemente resistentes y al secarse la muestra el centro se ha hundido (Figura 5.21). La observación de este perfil cóncavo de la superficie, permite descartar la formación de micelas. La formación de micelas esféricas es altamente improbable debido al tamaño de las moléculas de partida en comparación con las observadas por DLS. Sin embargo, sí que es esperable que estas moléculas se organicen formando una membrana que curvándose en un régimen diluido de lugar a agregados micelares tipo vesícula.

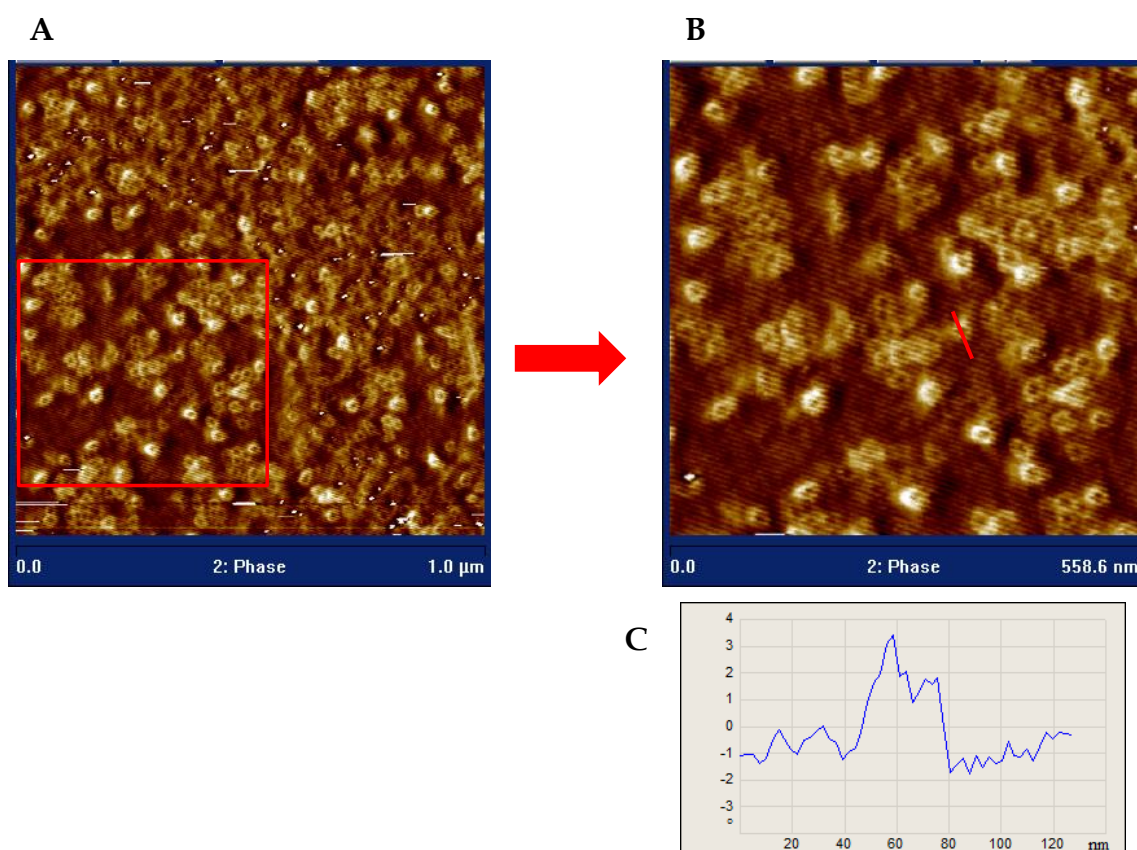


Figura 5.21 Imágenes de fase de AFM sobre vidrio de los agregados formados por β -L-man-Py- γ 3(R) NH_3^+ -Py-Ind (4) en H_2O . B, ampliación de la zona recuadrada en la imagen A. C, perfil en fase de la trayectoria marcada en la imagen B.

Para el caso de los agregados de la glico-oligoamida catiónica de xilosa (2), se encuentran también agregados circulares, pero de tamaños mayores que los observados con el derivado de L-manosa (4). Además, en esta ocasión parece estar más clara la naturaleza esférica de los agregados (Figura 5.22).

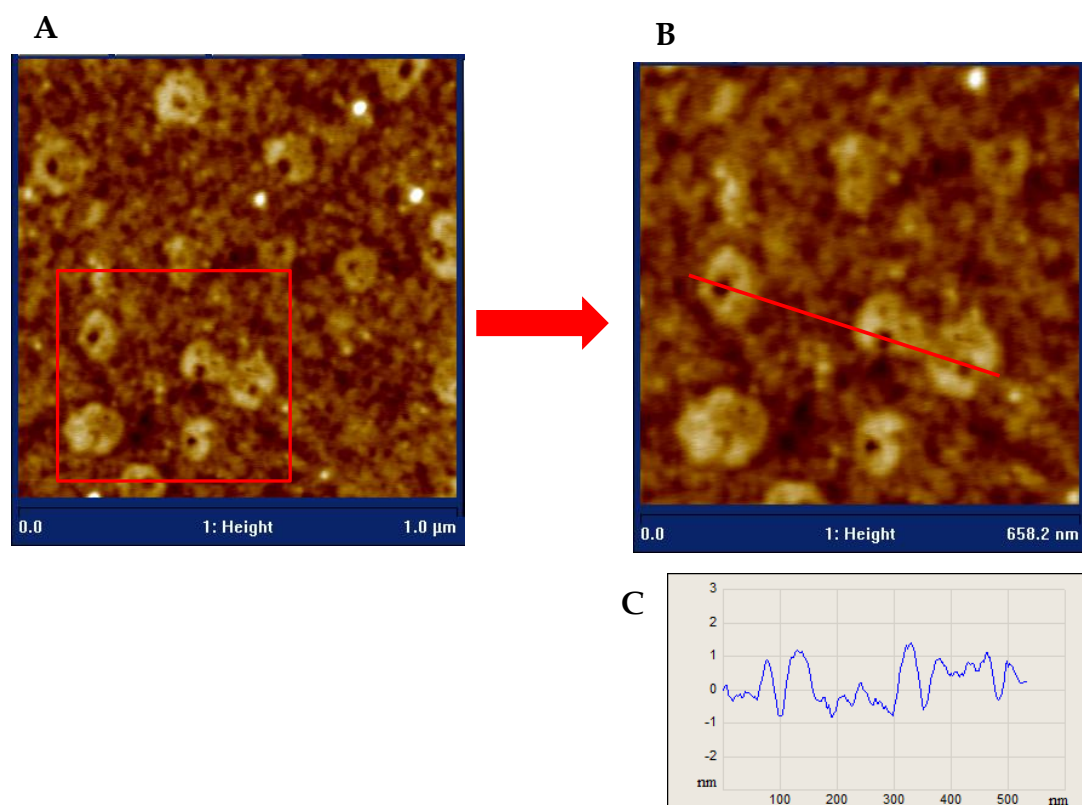


Figura 5.22 Imágenes de altura de AFM sobre vidrio de los agregados formados por β -D-xil-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) en H₂O. B, ampliación de la zona recuadrada en la imagen A. C, perfil en altura de la trayectoria marcada en la imagen B.

Adicionalmente, se prepararon también muestras de la glico-oligoamida neutra de D-manosa (β -D-Man-Py- γ -Py-Ind), pero empleando un 10% de acetona como codisolvente. Sorprendentemente, el resultado fue muy similar al observado para el derivado de L-manosa (4), encontrándose el mismo tipo de agregado circular (Figura 5.23).

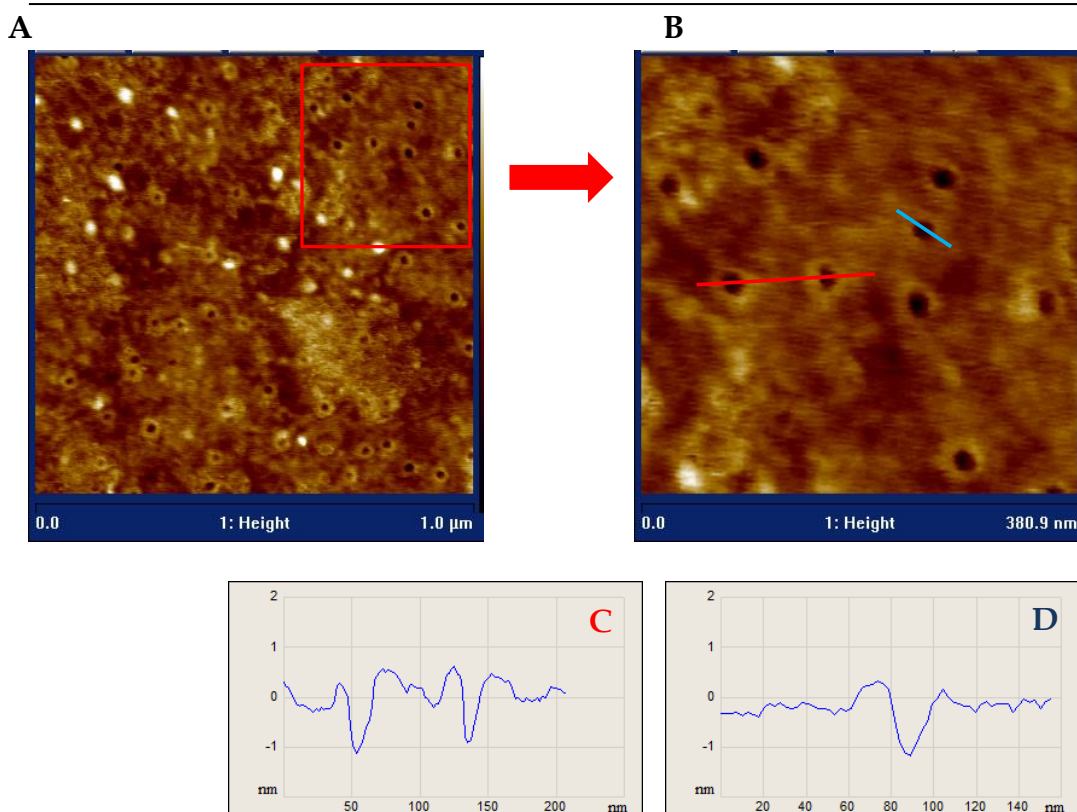


Figura 5.23 Imágenes de altura de AFM sobre vidrio de los agregados formados por β -D-man-Py- γ -Py-Ind en H₂O /acetona 10%. B, ampliación de la zona recuadrada en la imagen A. C, perfil de altura de la trayectoria marcada en rojo en la imagen B. D, perfil de altura de la trayectoria marcada en azul en la imagen B.

Gracias a la obtención de imágenes de AFM se ha logrado identificar la morfología esférica de los agregados, detectándose arquitecturas de tipo vesicular similares para todas las muestras, al margen de la naturaleza del carbohidrato. El que las glico-oligoamidas catiónicas formen agregados de tipo vesicular, está de nuevo en concordancia con las observaciones de los experimentos de ITC. La cinética de formación y ruptura de agregados vesiculares es relativamente lenta y por tanto, este proceso podría asociarse con la liberación lenta de calor en los experimentos de ITC.

5.4 Microscopía electrónica de barrido

Con el fin de confirmar la morfología esférica de los agregados y completar el estudio, también se registraron imágenes de SEM (SEM, Scanning Electron Microscopy). El microscopio electrónico de barrido, emplea un haz de electrones para formar una imagen ampliada de la superficie de un objeto. Es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de sólidos. Se emplean lentes electromagnéticas para conducir el haz de electrones hasta la muestra, barriendo su superficie y generando diferentes interacciones, lo que permite obtener imágenes con contraste topográfico o composicional.

Las muestras para registrar las imágenes de SEM, se prepararon con las mismas disoluciones empleadas en AFM. De nuevo, se observa la existencia de agregados esféricos de distintos tamaños (Figura 5.24). En estas imágenes, se aprecia el contraste de los agregados esféricos y su interior, confirmando la naturaleza hueca de estos

agregados. Además, se observa una membrana definida que estaría formada por las moléculas autoensambladas de glico-oligoamida catiónica.

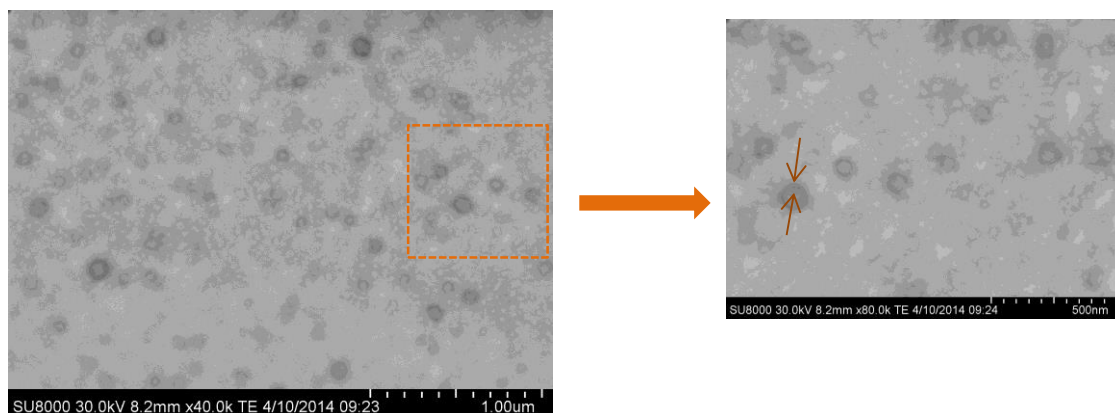


Figura 5.24 Imágenes de los agregados formados por el derivado de L-manosa (**4**) en H₂O

Gracias a las técnicas de AFM y SEM, se han obtenido por primera vez imágenes de agregados formados por las glico-oligoamidas catiónicas en agua, que han permitido describir su morfología. Las imágenes muestran que se forman agregados vesiculares huecos de diversos tamaños.

5.5 Experimentos de RMN: ¹H-RMN y DOSY

Como ya se ha mencionado en el inicio del capítulo, los experimentos de dilución por ¹H-RMN de las glico-oligoamidas, tanto neutras como catiónicas, realizados para descartar la posible influencia de procesos de agregación en los resultados de los estudios conformacionales por RMN en agua, nunca habían mostrado indicios de presencia de auto-asociación. Hasta el momento por esta técnica no se habían detectado signos de la existencia de agregados, tales como ensanchamiento de las señales, baja resolución del espectro, o desplazamientos químicos inducidos significativos por efecto de la concentración. Consecuentemente, después de confirmar la presencia de agregados en disolución acuosa por diversas técnicas de caracterización de los mismos, se planteó la duda de si este proceso era observable por RMN.

En primer lugar, se muestra a continuación el experimento mencionado de dilución por ¹H-RMN, que permitía descartar que los resultados de la comparación entre las glico-oligoamidas catiónicas y su modelo carbohidrato correspondiente, para confirmar la presencia de conformación de horquilla, se debiesen a la auto-asociación de las glico-oligoamidas catiónicas. El experimento se realizó con la glico-oligoamida catiónica derivada de L-manosa (**4**), en D₂O a 25 °C, comenzando con una concentración de 900 μM y diluyendo hasta 100 μM.

Los experimentos de ¹H-RMN a las distintas concentraciones muestran un ligero apantallamiento de algunas señales del compuesto **4**, a medida que se diluye la muestra. Las señales que ven modificado su desplazamiento son las correspondientes a

los residuos aromáticos y al fragmento γ (Figura 5.25 y Figura 5.26). Sin embargo, los protones del carbohidrato no sufren ninguna variación (Figura 5.26). Estas ligeras variaciones en los desplazamiento químicos, que oscilan entre 0.01 ppm y 0.03 ppm, pueden ser un indicio de la existencia de un pequeño porcentaje de compuesto agregado, que se ve afectado por la dilución de la muestra. No obstante, si se comparan estos valores de variación del desplazamiento químico, con los valores de desplazamiento químicos inducidos, obtenidos de comparar el modelo hebra-carbohidrato con su correspondiente glico-oligamida (valores por encima de 0.6 ppm hasta más de 1 ppm), son valores casi despreciables. Los espectros de RMN, son un promedio de las distintas especies que hay en disolución, y por lo tanto, al no tener variaciones significativas de los desplazamientos químicos de las señales, tenemos la certeza de la presencia mayoritaria de la glico-oligoamida catiónica libre en disolución. Además, atendiendo a las distribuciones de tamaño de agregado obtenidas mediante DLS, probablemente los agregados tan grandes no serían observados por RMN.

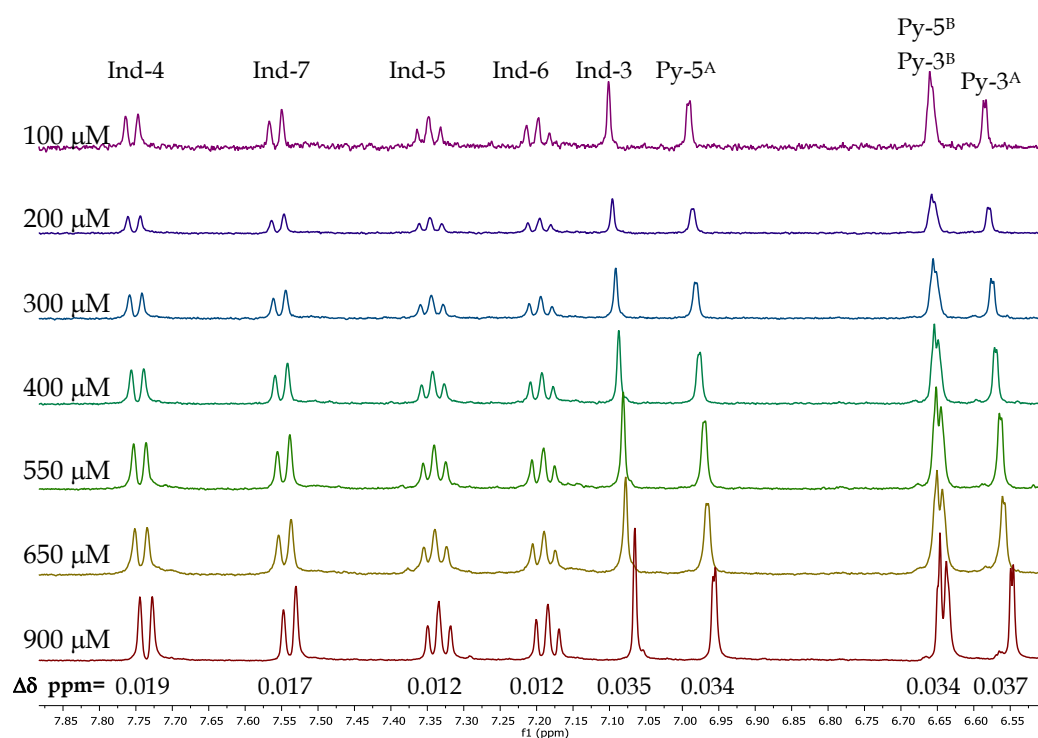


Figura 5.25 Región aromática del experimento de dilución de la glico-oligoamida catiónica β -L-man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) en D₂O a 25 °C.

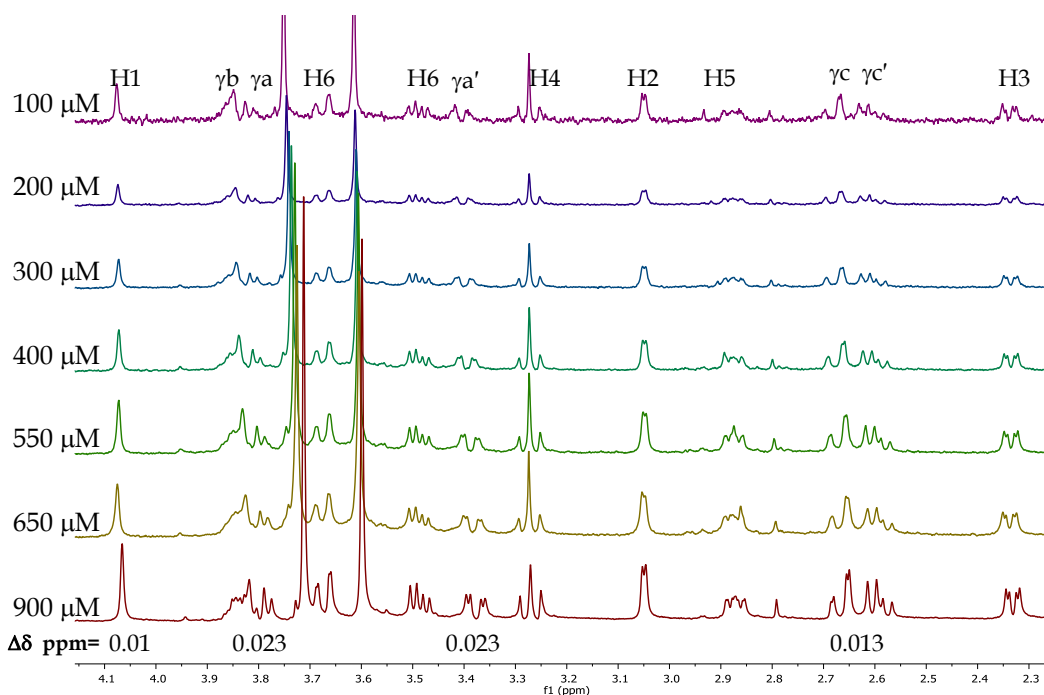


Figura 5.26 Región del carbohidrato y fragmento γ del experimento de dilución de la glico-oligoamida catiónica β -L-man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**) en D₂O a 25 °C.

Cabe destacar, que solo se ven afectados por la dilución los desplazamientos químicos de los residuos aromáticos y la cadena γ , por lo que se puede pensar que esas partes de la molécula están más implicadas en el proceso de agregación que el carbohidrato.

Para cada dilución también se realizó un experimento de difusión por RMN, para ver si había variaciones significativas en los coeficientes de difusión de las disoluciones de β -L-man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**) por efecto de la concentración. Como ya se ha mencionado en el apartado de DLS, la ecuación de Stokes-Einstein relaciona el coeficiente de difusión de una molécula concreta, en unas condiciones controladas (disolvente, temperatura) con su radio hidrodinámico y por lo tanto es posible obtener información de su tamaño y peso molecular. De este modo, los coeficientes de interacción son dependientes de su forma, tamaño y peso molecular, además de depender de posibles fenómenos de agregación o interacción intermolecular.

La espectroscopía DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) es un método de RMN para medir el coeficiente de difusión de una molécula y estimar su peso molecular. Además, la técnica DOSY proporciona la identificación separada de diversos compuestos presentes en una misma disolución. En el experimento, se registra una secuencia de experimentos ¹H-RMN con variaciones progresivas de un gradiente externo de campo magnético. Este gradiente aumenta a lo largo del experimento, provocando una atenuación de las señales de los protones presentes en la molécula en

disolución. El coeficiente de difusión (D) medido mediante DOSY, se obtiene de acuerdo a la siguiente ecuación:¹⁷

$$I_q = I_0 e^{-Dq^2\Delta'}$$

Donde D es el coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$); $q = \gamma \cdot g \cdot \delta$, donde γ es el radio giromagnético ($\text{rad s}^{-1} \text{G}^{-1}$), g es la amplitud del gradiente aplicado (G cm^{-1}) y δ la duración del gradiente aplicado (s); $\Delta' = \Delta - (\delta/3)$ periodo experimental de difusión (s).

Así, el valor de D está relacionado con la intensidad de señal y con el gradiente aplicado. Por lo tanto, el diferente decaimiento de la intensidad de señal da lugar a la medida de los distintos coeficientes de difusión de las diferentes moléculas que se encuentran en una misma disolución. De esta forma, los experimentos DOSY pueden ser procesados y presentados como una matriz 2D, donde en el eje x se sitúan los desplazamientos químicos de los protones y en el eje y los coeficientes de difusión. Mientras los desplazamientos químicos se obtienen a través de la transformada de Fourier, la información de la difusión se obtiene mediante una laplaciana inversa de la señal de decaimiento.¹⁸ En la Figura 5.27 se muestra un ejemplo de uno de los DOSY 2D obtenidos para β -L-man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**).

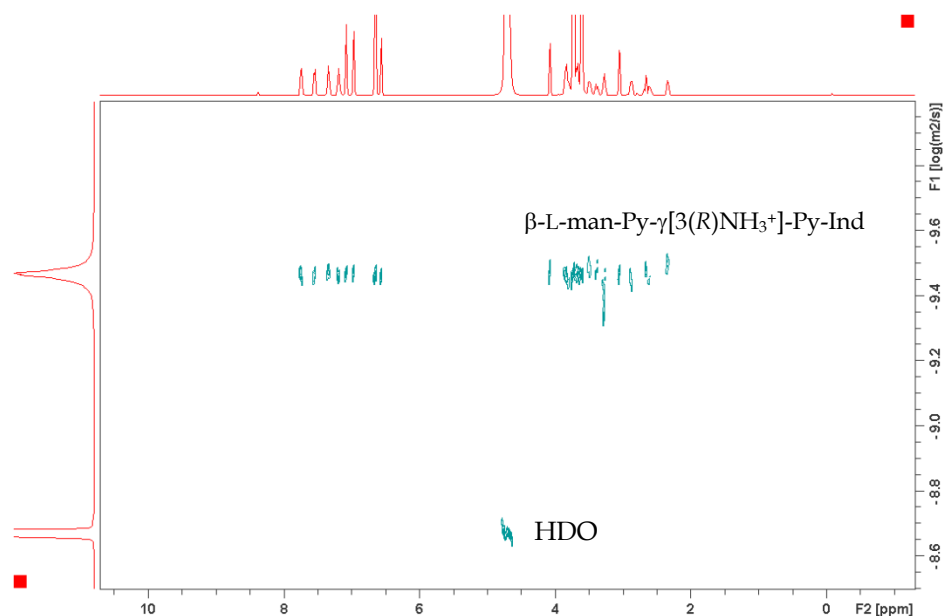


Figura 5.27 Espectro 2D DOSY de la glico-oligoamida catiónica β -L-man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**) 650 μM en D_2O a 25 °C. El eje x contiene el espectro ^1H -RMN y el eje y contiene la escala de difusión.

Los experimentos DOSY realizados a las distintas concentraciones muestran valores de $\log D$ entorno a -9.46 para el derivado de L-manosa, y de -8.67 para la señal residual de disolvente a 4.7 ppm.

¹⁷ Groves, P.; Palczewska, M.; Dolores Molero, M.; Batta, G.; Javier Cañada, F.; Jiménez-Barbero, J. *Anal. Biochem.* **2004**, 331, 395.

¹⁸ Cohen, Y.; Avram, L.; Frish, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 520.

Tabla 5.1 Valores de D obtenidos para cada concentración del derivado de L-manosa 4

$[\beta\text{-L-man-Py-}\gamma[3(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}] \mu\text{M}$ (4)	Log D
100	9.464
200	9.460
300	9.470
400	9.473
550	9.475
650	9.476

Como se observa en la Tabla 5.1, a lo largo del experimento se observa una ligera tendencia a aumentar el coeficiente de difusión a medida que aumenta la concentración (hay una variación de 0.012 en la escala logarítmica), que se correspondería con una tendencia al aumento de tamaño de la especie en disolución. Sin embargo, esta variación no es muy significativa y se encontraría cercana al error propio de la medida. Además, como se observa en la Figura 5.28, también hay pequeñas variaciones en los valores de Log D para las señales de referencia del TSP y del HDO.

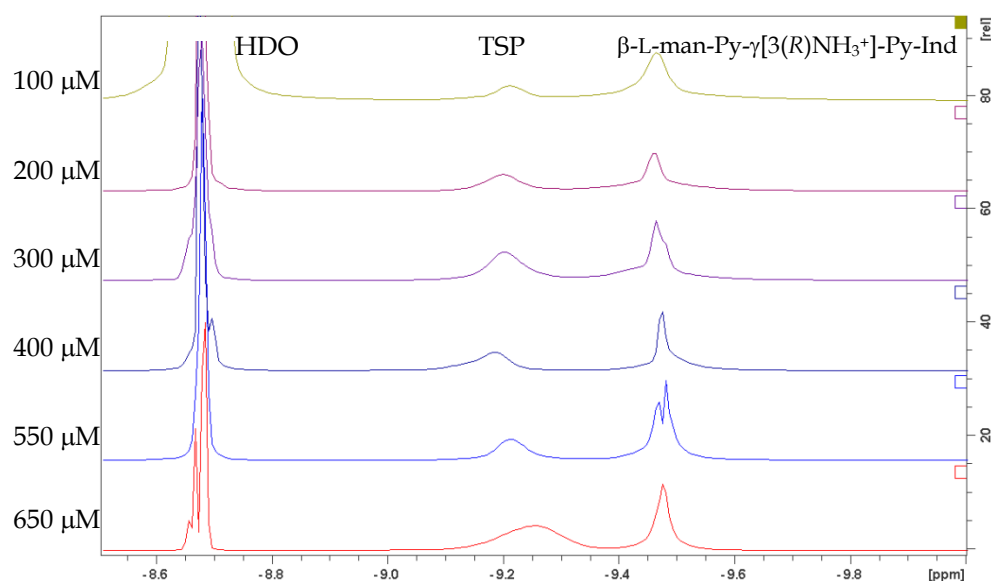


Figura 5.28 Traza monodimensional de los espectros DOSY 2D correspondiente a los coeficientes de difusión de $\beta\text{-L-man-Py-}\gamma[3(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ (4) obtenidos de los diferentes experimentos DOSY realizados a distintas concentraciones, la señal de TSP y HDO sirven como referencia.

El valor del coeficiente de difusión aislado no proporciona mucha información por sí solo, y es necesario introducirlo en una recta de calibración, que relacione coeficientes de difusión con pesos moleculares de moléculas similares en cuanto a tamaño y forma, para poder relacionarlo con el peso molecular aproximado al que corresponde. Dada la particular forma de las glico-oligoamidas catiónicas, es complicado encontrar estructuras muy similares con las que comparar. Finalmente, se optó por realizar la comparación con una serie de derivados sacarídicos de N-

acetilglucosamina (GlcNAc)_n, que van desde el monosacárido (GlcNAc)₁ hasta el pentasacárido (GlcNAc)₅.¹⁹

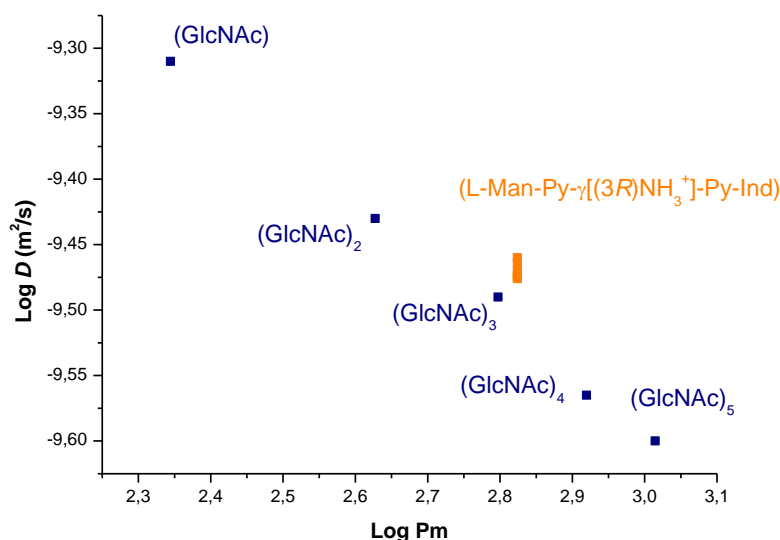


Figura 5.29 Gráfica de calibrado de coeficientes de difusión de los derivados de (GlcNAc)_n

Como se puede ver en la gráfica de la Figura 5.29, los coeficientes de difusión obtenidos para la glico-oligoamida catiónica de L-manosa (**4**) (Pm = 666), se encuentran próximos al coeficiente de difusión correspondiente al trímero de GlcNAc, cuyo peso molecular es de 627. Por lo que en primer lugar se podría decir que el coeficiente de difusión obtenido para el derivado de L-manosa corresponde al monómero. Además, para los oligosacáridos de GlcNAc, se observa que, cuando se pasa del monómero al dímero de GlcNAc, el coeficiente de difusión de la molécula aumenta en 0.12 unidades logarítmicas, y al pasar del dímero al tetramero en 0.13 unidades logarítmicas. Sin embargo, los coeficientes de difusión obtenidos a lo largo del experimento de dilución del compuesto (**4**), solo muestran un aumento de 0.012 unidades en la escala logarítmica. Si se compara con el aumento de coeficiente de los oligosacáridos, a medida que aumenta el peso molecular de estos, esta variación de 0.012 no sería indicativa de la presencia de agregados en disolución.

Considerando que en disolución hay una mezcla de glico-oligoamida catiónica en forma de monómero, pero también agregados de mayor tamaño, el coeficiente de difusión será un promedio de ambas especies en disolución.

$$D_{obs} = X_{mon}D_{mon} + (1 - X_{mon})D_{agr}$$

Donde D_{obs} es el coeficiente de difusión observado, X_{mon} es la fracción molar de monómero en disolución, D_{mon} el coeficiente de difusión del monómero y D_{agr} el coeficiente de difusión del agregado. Los resultados apuntan a que en el coeficiente de

¹⁹ Groves, P.; Rasmussen, M. O.; Molero, M. D.; Samain, E.; Cañada, F. J.; Driguez, H.; Jiménez-Barbero, J. *Glycobiology* **2004**, *14*, 451.

difusión observado tiene una mayor influencia el término correspondiente al monómero, que el término correspondiente a las especies agregadas, y como consecuencia en disolución habría un mayor porcentaje de monómero en disolución que de agregado.

5.6 Conclusiones del capítulo

En este capítulo se ha estudiado la capacidad de agregación de las glico-oligoamidas catiónicas en disolución acuosa mediante diversas técnicas, DLS, ^1H -RMN, AFM y SEM. El estudio fue orientado a la explicación del fenómeno encontrado en los experimentos de ITC, donde se observó un proceso de liberación de energía durante la dilución de las glico-oligoamidas catiónicas.

Gracias a las medidas de DLS, se ha concluido que las glico-oligoamidas catiónicas en disolución acuosa forman agregados de alto peso molecular no observables por RMN. En principio, hay una analogía entre el perfil de distribuciones de tamaños de los distintos derivados, al margen del carbohidrato que contengan en su estructura. Hay indicios de que el fragmento oligoamídico puede ser el promotor del proceso de agregación. No obstante, estos experimentos también apuntan a la coexistencia en disolución tanto de agregados como de monómero.

De acuerdo con lo observado en DLS, parece que tanto la manera de preparar las disoluciones como la concentración puede tener una influencia en el porcentaje de monómero en disolución y en el proceso de agregación. Sin embargo, la dilución de una disolución concentrada de glico-oligoamida catiónica, el cambio del tampón o la adición de DMSO como codisolvente, no genera la ruptura y desaparición de los agregados.

El uso de técnicas de microscopía como AFM y SEM, ha permitido la caracterización morfológica de los agregados. Se generan agregados esféricos de arquitectura vesicular hueca. Esto concuerda con que el proceso de liberación lenta de calor observado por ITC, sea debido a la ruptura de agregados, ya que la ruptura de vesículas tiene una cinética lenta.

Las diversas técnicas empleadas en los diferentes estudios de las glico-oligoamidas catiónicas, tienen distintas limitaciones a la hora de caracterizar todas las especies que se encuentran presentes en disolución acuosa. Tanto los experimentos de difusión como los experimentos de dilución monodimensionales por RMN, indican la presencia de monómero en disolución. Por el contrario, los experimentos de DLS indican presencia en disolución de agregados de elevado peso molecular. Estos agregados probablemente no son observables por RMN debido a su elevado tamaño. Mientras el monómero en disolución no es detectado por DLS. El uso de las distintas técnicas permite estudiar independientemente las distintas especies coexistentes en disolución, obteniéndose información de cada una de las especies en equilibrio en cada caso.

5.7 Experimental section

5.7.1 *Dynamic Light Scattering*

Size distribution and Z-potential measurements were carried out on a Malvern Zetsizer Nano ZS (red badge ZEN3600) equipped with a laser of 633 nm (Malvern Instruments). For size distribution measurements a glass cuvette was used with a 1cm length path. For Z-potential a folded capillary polystyrene cells were used. All measurements were performed at 25 °C.

Two different methods were used to prepare the DLS solutions:

In the first one, the lyophilized cationic glyco-oligoamides Eppendorf were dissolved in phosphate buffer to provide DLS solutions, affording 100, 350 and 700 μM concentrations.

In the second method, 1 mg of the suitable cationic glyco-oligoamide was dissolved in a certain volume of buffer (or water) giving a stock solution. By dilution of stock solution the rest of the diluted solutions were obtained. When DMSO is used, then, the glyco-oligoamides were directly dissolved in DMSO and then diluted with buffer.

5.7.2 *Atomic Force Microscopy*

AFM measurements were performed on a MultiMode SPM Nanoscope IV, Veeco/Bruker operating in tapping mode at room temperature.

Cationic glyco-oligoamides solutions were prepared by dissolving 0.5 mg of compound in the appropriate volume to get a 500 μM stock solution. Stock solution was diluted in order to obtain different diluted solutions 200 μM , 100 μM , 50 μM .

AFM samples with the three cationic glyco-oligoamides were prepared by two methods by using different solutions at diverse concentrations. In one of them, a drop of solution was placed on a glass surface and the solvent was evaporated. The second one, glyco-oligoamide solution was spread over the glass surface, and the micro-drops were later evaporated.

5.7.3 *Scanning Electron Microscopy (SEM)*

SEM experiments were carried out on a high resolution scanning electron microscope Hitachi SU-8000. Copper grids coated with Formvar® film and stabilized with a “light” layer of carbon, 200 mesh, were purchased from Ted Pella (ref. 01801).

Same solutions from AFM were used to prepare SEM samples with the three cationic glyco-oligoamides. Preparation of SEM samples for glyco-oligoamides was done by dropping a small volume of glyco-oligoamide solution onto a copper grid and removing the solvent excess with paper.

5.7.4 NMR dilution experiment and DOSY.

A starting solution of L-mannose glyco-oligoamide 650 μM was prepared as explained in chapter 3, 3.6.3 section. Afterwards, sequential dilutions from the same sample afforded solutions 550, 400, 300, 200 and 100 μM .

^1H -NMR spectra were recorded for each concentration on a Avance Bruker 500MHz spectrometer.

DOSY experiments were also recorded for each concentration. The standard Bruker DOSY protocol was used at 298 K on an Avance 500 MHz equipped with a broad-band z-gradient probe. Thirty-two 1D ^1H spectra were collected with a gradient duration of $\delta = 0.19$ s and an echo delay of $\Delta = 1$ s for cationic glyco-oligoamides. The ledbpg2s pulse sequence, with stimulated echo, longitudinal eddy current compensation, bipolar gradient pulses, and two spoil gradients, was run with a linear gradient (53.5 G cm^{-1}) stepped between 2% and 95%. The 1D ^1H spectra were processed and automatically baseline corrected.

6. **CAPÍTULO 6**

GENERAL CONCLUSIONS

In summary we have developed an efficient convergent solution phase method for the synthesis of new cationic glyco-oligoamides. The new cationic vector general structure is: carbohydrate-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind.

As a result, three new cationic glyco-oligoamides were synthesized containing in their structure just the desired β anomer: β -D-Xyl-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**), β -D-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) and β -L-Man-Py- γ [3(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**). The obtained global yields for each one were 11%, 20% y 12% respectively.

Additionally, the use of this methodology allow us to obtain the single strand carbohydrate models D-Xyl-Py-NHAc **5** and D-Man-Py-NHAc **6** with global yields of 60% y 55%.

A comparative study was carried out between the new cationic glyco-oligoamides and the neutral analogues. The new cationic vector design has improved aqueous solubility properties of cationic glyco-oligoamides. The solubility was increased by a factor of two regarding the neutral glyco-oligoamides.

NMR conformational studies in water of all the new cationic glyco-oligoamides have shown an important percent of folded hairpin conformation in aqueous media, as observed for the neutral analogues. The hairpin conformation has a crescent shape defining two different rims: one delimited by the NH amide present in the structure and the other one established by pyrrole methyl groups. This hairpin conformation is temperature dependent, at low temperature hairpin is more well defined that at room temperature.

In this folded hairpin conformation, depending on the carbohydrate involved, a specific carbohydrate face (α o β) oriented towards the indole ring can be defined. The nature of the carbohydrate has a deep effect on hairpin folding stability.

NMR interaction studies of new cationic glyco-oligoamides with DNA polymers (Poly(dA-dT)₂ and Poly(dG-dC)₂) have revealed that new derivatives are DNA minor groove binders showing qualitatively an improved binding affinity regarding the neutral glyco-oligoamides. Furthermore, they exhibit a preference towards AT sequences.

Due to the successful cationic vector design, for the first time, it was possible to carry carbohydrates to GC sequences with this type of glyco-conjugates. Therefore, for the first time, we were able to reach GC sequences with the carbohydrate to obtain structural information about that particular interaction.

Consequently, in order to be able to study the new cationic glyco-oligoamides-GC complexes a DF-STD experiment was optimized.

Conformational studies of the cationic glyco-oligoamides-DNA complex in water have shown how ligand conformation in the bound state with Poly(dA-dT)₂ and Poly(dG-dC)₂, is similar to conformation found in the free state. Moreover, these

conformational studies have demonstrated that the carbohydrate moiety is placed inside the DNA minor groove in both types of DNA complexes, with Poly(dA-dT)₂ and Poly(dG-dC)₂.

New cationic glyco-oligoamides with D-Mannose and L-Mannose carbohydrates have been designed to include in the carbohydrate residue a cooperative hydrogen bonding donor. Consequently, characterization of NH5...OH2 hydrogen bond in water was key point. Evidence of the presence of NH5...OH2 hydrogen bond in water was found by NMR and DFT theoretical studies, in the new cationic glyco-oligoamides including carbohydrates with cooperative hydrogen bonding centers, β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) and β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**).

For D y L-mannose cationic glyco-oligoamides (**3** and **4**) there is a preference for a specific carbohydrate orientation regarding hairpin conformation, α carbohydrate face is pointing towards the indole ring. CH- π interactions are at the origin of specific face selection.

NMR and DFT theoretical studies suggested that depending on the carbohydrate chirality (D-mannose or L-mannose), two opposite 3D folds are originated, where amino group from γ fragment is placed in different orientation. For D-mannose derivative (**3**) amino group is pointing towards the NH inner rim while in L-mannose derivative (**4**) is pointing towards the outer NMe rim.

A comparative study between derivatives **3** and **4**, and carbohydrate model β -D-Man-Py-NHAc (**6**) have shown that intramolecular hydrogen bonding NH5...OH2 does not survive in water in the case of carbohydrate model (**6**). This fact suggests that the efficacy of CH- π interactions between α mannose face and indole ring, may have influence on hydrogen bond stability in aqueous media.

DNA binding properties of cationic glyco-oligoamides diastereomers (**3** and **4**) are influenced by the different carbohydrate chirality. Qualitatively ¹H-NMR titrations have shown how L-mannose derivative is the most efficient ligand for both types of sequences, AT and GC.

ITC interaction studies were performed with all cationic glyco-oligoamides and FS-DNA and Poly(dA-dT)₂. ITC methodology was optimized for our system in order to achieve thermodynamic information of cationic glyco-oligoamide-DNA interaction.

ITC experiments confirmed the higher affinity of β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**) with Poly(dA-dT)₂ comparing to its diastereomer β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**). Thermodynamic parameters were obtained for derivative **4** interacting with Poly(dA-dT)₂.

NMR structural studies, i.e. TR-NOESY, DF-STD, of cationic glyco-oligoamides-DNA complexes (AT and GC) showed different carbohydrate orientation in each glyco-oligoamide. In the case of GC complex with L-mannose ligand (**4**), cooperative hydrogen bonding donor center OH2 is located in the inner region of the DNA minor

groove. Contrary to this situation, in the complex with D-mannose ligand (**3**), OH2 is pointing out the minor groove. This may contribute to different binding affinities between both ligands.

While performing ITC ligand-DNA interaction studies, glyco-oligoamide self-assembly process in aqueous media was found.

Self-assembly process of the cationic glyco-oligoamides was confirmed and studied by means of DLS, SEM and AFM, revealing spherical aggregates with characteristics corresponding to vesicular architectures.

Aggregates from different cationic glyco-oligoamides are similar to each other, independently of the carbohydrate involved. Therefore, our hypothesis is that oligoamide fragment is directing the self-assembly process but not the carbohydrate.

In aqueous solution there is a dynamic equilibrium between single molecules of cationic glyco-oligoamides and aggregates. Each species from this equilibrium can be studied depending on the used technique, meaning that monomer in solution is detected by NMR while aggregates are observed by DLS.

CONCLUSIONES GENERALES

Se ha diseñado y optimizado una ruta sintética convergente en disolución eficaz para la obtención de las nuevas glico-oligoamidas catiónicas. El nuevo vector catiónico tiene como estructura general $\text{Py-}\gamma[3(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$.

De esta forma, se han logrado sintetizar tres nuevas glico-oligoamidas catiónicas, $\beta\text{-D-Xil-Py-}\gamma[3(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ (**2**), $\beta\text{-D-Man-Py-}\gamma[3(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ (**3**) y $\beta\text{-L-Man-Py-}\gamma[3(R)\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind}$ (**4**), conteniendo el deseado anómero β exclusivamente, mediante el empleo la ruta diseñada, con unos rendimientos globales de 11%, 20% y 12% respectivamente.

Además, el uso de esta vía de síntesis facilitó la obtención de los modelos de hebra carbohidrato de D-Xil-Py-NHAc **5** y D-Man-Py-NHAc **6** con unos rendimientos globales del 60% y 55%.

Se ha realizado un estudio comparativo entre las nuevas glico-oligoamidas catiónicas y sus análogas neutras. Gracias al nuevo vector catiónico se ha logrado una mejora de la solubilidad en agua de las glico-oligoamidas catiónicas, llegando a duplicarse con respecto a los derivados neutros.

El estudio conformacional por RMN en agua de todas las nuevas glico-oligoamidas catiónicas indica la presencia en disolución acuosa de un porcentaje de conformación plegada en forma de horquilla, al igual que sucedía con sus análogas neutras. Esta conformación plegada se caracteriza por tener cierta curvatura y generar dos arcos: un arco delimitado por los NH de la estructura y otro definido por los metilos de los pirroles. El efecto de la temperatura influye sobre la estabilidad de la conformación plegada, a temperatura baja la horquilla está más definida que a temperatura ambiente.

En esta conformación plegada en forma de horquilla, dependiendo del carbohidrato presente en la estructura, es posible definir qué cara del carbohidrato (α o β) se orienta hacia el indol. La naturaleza del carbohidrato influye en la mejor definición de la conformación plegada.

El estudio de la interacción de las nuevas glico-oligoamidas catiónicas con polímeros de ADN (Poly(dA-dT)_2 y Poly(dG-dC)_2) por RMN muestra que los nuevos derivados son ligandos del surco menor del ADN que presentan a nivel cualitativo una afinidad mejorada con respecto a sus análogos neutros. Además, se ha mostrado que conservan la preferencia por pares de bases AT.

Gracias al éxito en el diseño del nuevo vector catiónico, por primera vez se logra en nuestro grupo de investigación acercar carbohidratos a secuencias compuestas exclusivamente por pares GC. Por lo tanto, cabe destacar que por primera vez se logra información estructural de complejos carbohidrato con secuencias GC.

Asimismo, se ha puesto a punto un experimento de DF-STD para el estudio de los nuevos complejos de glico-oligoamidas catiónicas con secuencias compuestas exclusivamente por GC.

Los estudios conformacionales en agua de los complejos de las nuevas glico-oligoamidas catiónicas han revelado que la conformación adoptada en el estado asociado con Poly(dA-dT)₂ y con Poly(dG-dC)₂ es análoga a la hallada en el estado libre. Además con estos estudios, se ha comprobado que el carbohidrato se introduce en el surco menor del ADN en ambos tipos de polímeros del ADN.

Las glico-oligoamidas catiónicas derivadas de D-manosa (**3**) y L-manosa (**4**) han sido diseñadas para que el carbohidrato contenga un centro dador cooperativo de enlace de hidrógeno. Por lo tanto, en primer lugar, se ha demostrado la existencia del enlace de hidrógeno NH₅...OH₂ en agua en ambos derivados, β-D-Man-Py-γ[(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**) y β-L-Man-Py-γ[(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**) mediante estudios de RMN y cálculos teóricos DFT.

En ambas glico-oligoamidas catiónicas derivadas de D y L-manosa (**3** y **4**) existe una selección de la cara α del carbohidrato hacia el indol. Las interacciones CH-π pueden ser el origen de esta selección de cara específica.

Estudios de RMN en agua y cálculos teóricos, apuntan a que en las glico-oligoamidas catiónicas diastereómeras derivadas de D y L-manosa (**3** y **4**), se generan dos plegamientos tridimensionales opuestos dependiendo de la quiralidad del carbohidrato, D o L. En uno de ellos el grupo amino del fragmento γ, se orienta hacia el arco NH (derivado **3**) y en el otro hacia el arco NMe (derivado **4**).

Por otro lado, el estudio comparativo de estas glico-oligoamidas catiónicas (**3** y **4**) con el modelo hebra carbohidrato β-D-Man-Py-NHAc (**6**), apunta a que el enlace de hidrógeno NH₅...OH₂ no sobrevive en agua en el modelo hebra carbohidrato. Este hecho sugiere que en el caso de los derivados de manosa, las demostradas eficaces interacciones CH-π entre la cara α del carbohidrato y el indol, puedan tener una influencia en la estabilidad del enlace de hidrógeno intramolecular en agua.

La distinta quiralidad del carbohidrato de las glico-oligoamidas catiónicas diastereómeras con centros cooperativos de enlace de hidrógeno (**3** y **4**) también influye en la afinidad de los ligandos por el ADN. En las valoraciones por RMN, a nivel cualitativo, se observa cómo, tanto para secuencias de pares de bases AT como para secuencias GC, el derivado de L-manosa resulta ser el ligando más eficaz.

Se han realizado estudios de interacción mediante ITC en la universidad de Cardiff en colaboración con Niklaas Buurma, con todos los derivados catiónicos y los polímeros de ADN, FS-ADN y Poly(dA-dT)₂. Se logró optimizar una metodología de valoraciones reversas por ITC para cuantificar, en la medida de lo posible, la interacción de las glico-oligoamidas catiónicas.

Mediante los estudios de interacción por ITC se pudo confirmar que el ligando β-L-Man-Py-γ[(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**4**) tiene mayor afinidad por el Poly(dA-dT)₂ que su diastereómero β-D-Man-Py-γ[(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**3**). Además, se han obtenido

parámetros termodinámicos del proceso de interacción del ligando (**4**) con Poly(dA-dT)₂.

Los estudios estructurales de los complejos de las glico-oligoamidas catiónicas **3** y **4**, con Poly(dA-dT)₂ y Poly(dG-dC)₂ mediante DF-STD y TR-NOESY, indican una orientación distinta del carbohidrato en cada caso. Para los complejos con secuencias GC, en el derivado de L-manosa (**4**) el centro donador cooperativo de enlace de hidrógeno OH2, se orienta directamente hacia el interior del surco menor del polímero de ADN. Sin embargo para el mismo complejo con el derivado de D-manosa (**3**), este centro queda situado hacia la región externa del surco menor. Esta diferente orientación podría contribuir a las diferencias encontradas en la afinidad entre ambos ligandos.

Durante el estudio de la interacción de las glico-oligoamidas catiónicas con ADN mediante ITC, se encontraron indicios de un proceso de agregación de los ligandos en agua.

Se confirmó la presencia de un proceso de agregación lento de las glico-oligoamidas catiónicas en disolución acuosa mediante DLS, SEM y AFM. Se forman agregados supramoleculares de naturaleza vesicular hueca y morfología esférica.

Se obtienen agregados de las distintas glico-oligoamidas similares, al margen del carbohidrato que contengan. Como consecuencia, la hipótesis propuesta es que el proceso de agregación está principalmente gobernado por el fragmento oligoamídico y no por el carbohidrato.

En disolución acuosa hay un equilibrio dinámico entre la glico-oligoamida como monómero y los agregados de mayor tamaño. En función de la técnica empleada para el estudio del sistema se obtiene información de uno de los componentes del sistema. Esto significa, que mientras la RMN detecta el monómero en disolución, el DLS, detecta los agregados.

ANEXOS

ANEXO CAPÍTULO 4

A continuación se muestran las tablas con los resultados obtenidos de los ensayos de solubilidad.

Ensayo con la glico-oligoamida neutra de manosa.

Tabla 1 Valores de las áreas de los picos de HPLC ($\lambda=230$ nm - 400 nm) obtenidos para cada concentración, el valor medio de las tres medidas, su desviación estándar y el error estadístico de la media

[Man neut] (μ M)	Área HPLC 1	Área HPLC 2	Área HPLC 3	Media	σ	EEM
10	416592	410296	415988	414292	3473.79	2005.59
25	1227637	1223118	1224366	1225040.3	2333.75	1347.39
50	2354954	2355950	2352794	2354566	1613.38	931.48
100	4665699	4669596	4672089	4669128	3220.60	1859.42
175	8228895	8233328	--	8231111.5	3134.60	1809.76
250	11239714	11272049	11227956	11246573	22832.71	13182.47
Disolución saturada	6490724	6440278	6370643	6433881.67	60295.49	34811.62

Ecuación	Solubilidad
$y = 45350x + 79515$	$Y = 6433882$
Donde	
$Y = \text{HPLC área}$	$X = 140 \mu\text{M en el vial de HPLC}$
$X = [\text{Man neutra}]$	
Volumen total vial	200 μL
Volumen inicial de Don de compuesto	20 μL
[Man neut] sat =	1401 μM

Tabla 2 Valores de las áreas de los picos de HPLC ($\lambda_{\text{max}}=302$ nm) obtenidos para cada concentración, el valor medio de las tres medidas, su desviación estándar y el error estadístico de la media

[Man neut] (μ M)	Área HPLC 1	Área HPLC 2	Área HPLC 3	Media	σ	EEM
10	381694	376511	381057	379754	2826.52	1631.89
25	1127787	1122059	1125109	1124985	2866.01	1654.69
50	2159224	2161618	2158280	2159707.33	1720.69	993.44
100	4278309	4281318	4284774	4281467	3235.07	1867.77
175	7536511	7537986		7537248.5	1042.98	602.17
250	10267992	10286432	10242813	10265745.67	21896.09	12641.71
Disolución saturada	5949651	5896669	5839123	5895147.67	55279.7	31915.75

Ecuación		Solubilidad	
$y = 41407x + 81788$	$Y =$	5895148	
Donde			
$Y = \text{HPLC área}$	$X =$	140.4	μM en el vial de HPLC
$X = [\text{Man neutra}]$			
	Volumen total vial	200 μL	
	Volumen inicial de Don de compuesto	20 μL	
	$[\text{Man neutr}] \text{ sat} =$	1404	μM

Ensayo con la glico-oligoamida catiónica de manosa 3.

Tabla 3 Valores de las áreas de los picos de HPLC ($\lambda = 230 \text{ nm} - 400 \text{ nm}$) obtenidos para cada concentración, el valor medio de las tres medidas, su desviación estándar y el error estadístico de la media

[Man cat] (μM)	Área HPLC 1	Área HPLC 2	Área HPLC 3	Media	σ	EEM
25	699208	707605	728892	711901.67	15301.34	8834.23
50	1440548	1466479	1429670	1445565.67	18910.54	10918.00
100	2922696	2922169	2924683	2923182.67	1325.78	765.446
175	5054711	5040702	5042195	5045869.33	7693.41	4441.79
250	6826110	6798634	6809242	6811328.67	13856.34	7999.96
Disolución saturada	2486157	2492960	2474841	2484652.67	9152.69	5284.31

Ecuación		Solubilidad	
$y = 27320x + 109164$	$Y =$	2484653	
Donde			
$Y = \text{HPLC área}$	$X =$	86.95	μM en el vial de HPLC
$X = [\text{Man catiónica}]$	2ª dilución:		
	Volumen total vial	150 μL	
	Volumen inicial de Don de compuesto	50 μL	
	$[\text{Man cat}] =$	260.85	μM en el vial de HPLC
	1ª dilución:		
	Volumen total vial	200 μL	
	Volumen inicial de Don de compuesto	20 μL	
	$[\text{Man cat}] \text{ sat} =$	2609	μM

Tabla 4 Valores de las áreas de los picos de HPLC ($\lambda_{max} = 302$ nm) obtenidos para cada concentración, el valor medio de las tres medidas, su desviación estándar y el error estadístico de la media

[Man neut] (μ M)	Área HPLC 1	Área HPLC 2	Área HPLC 3	Media	σ	EEM
25	651348	656700	680095	662714.33	15288.12	8826.60
50	1333906	1341479	1325445	1333610	8021.10	4630.98
100	2701621	2700938	2698047	2700202	1897.27	1095.39
175	4653641	4645905	4645949	4648498.3	4453.73	2571.36
250	6268412	6260454	6529960	6352942	153353.71	88538.81
Disolución saturada	2290127	2288239	2277430	2285265.3	6850.95	3955.40

Ecuación	Solubilidad	
$y = 25438x + 87090$	Y=	2285265
Donde		
Y = HPLC área	X=	86.41 μ M en el vial de HPLC
X = [Man catiónica]	2 ^a dilución:	
	Volumen total vial	150 μ L
	Volumen inicial de	50 μ L
	D ^{on} de compuesto	
	[Man cat] =	259.24 μ M en el vial de HPLC
	1 ^a dilución:	
	Volumen total vial	200 μ L
	Volumen inicial de	20 μ L
	D ^{on} de compuesto	
	[Man cat] sat =	2592.4 μ M

A continuación se muestran las tablas con los desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de las resonancias de la glico-oligoamidas catiónica de xilosa **2** (β -D-xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind) y del modelo hebra carbohidrato **5** (β -D-xil-Py-NHAc) en una mezcla H₂O/acetona-d₆, 90:10, a -15 °C.

Tabla 5 Desplazamiento químico (ppm ± 0.01), multiplicidad y contantes de acoplamiento de las resonancias de los protones aromáticos y del fragmento γ en el espectro de ¹H-RMN de la glico-oligoamidas catiónica **2** y el modelo **5** en H₂O:acetona-d₆ (90:10) a -15 °C. Referencia TSP-d₄ (0.00 ppm).

		β -D-xil-Py- γ [(R)NH ₃ ⁺]-Py-Ind 2	β -D-xil-Py-NHAc 5
INDOL	Ind-4	7.77 (d, J = 8.8 Hz)	-
	Ind-7	7.57 (d, J = 8.5 Hz)	-
	Ind-6	7.37 (d, J = 8.0 Hz)	-
	Ind-5	7.21 (d, J = 8.0 Hz)	-
	Ind-3	7.20 (s)	-
PIRROL	Py-5 ^A	7.13 (s)	-
	Py-5 ^B	6.89(s)	7.19 (s)
	Py-3 ^A	6.68(s)	-
	Py-3 ^B	6.66(s)	6.84 (s)
	Me ^A	3.78 (s)	-
	Me ^B	3.64 (s)	-
CADENA γ	γ ^a	3.86-3.79 (m)	-
	γ ^{a'}		-
	γ ^b	3.91 (s.a.)	-
	γ ^c	2.77-2.71 (m)	-
	γ ^{c'}	2.67-2.60 (m)	-

Tabla 6 Desplazamiento químico (± 0.01 ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento de las resonancias de los protones correspondientes al carbohidrato en el espectro de ^1H -RMN de la glico-oligoamida catiónica 2 y el modelo 5 en $\text{H}_2\text{O}:\text{acetona-}d_6$ (90:10) a -15°C . Referencia TSP- d_4 a 0.00ppm.

		$\beta\text{-D-xil-Py-}\gamma[\text{R}(\text{NH}_3^+)]\text{-Py-Ind}$ 2	$\beta\text{-D-xil-Py-NHAc}$ 5
CARBOHIDRATO	H1	4.64 (dd, $J = 9.2, 9.2$ Hz)	5.01 ^a
	H5	3.70-3.66 (m)	3.96 (dd, $J = 11.8, 5.5$ Hz)
	H2	3.41 (dd, $J = 9.1, 9.1$ Hz)	3.58-3.49 (m)
	H3	3.38-3.30 (m)	3.58-3.49 (m)
	H4	3.38-3.30 (m)	3.70 – 3.61 (m)
	H5'	3.11 (dd, $J = 11.5, 11.5$ Hz)	3.43 (dd, $J = 11.8, 11.3$ Hz)

^a Observado mediante experimento TOCSY.

Tabla 7 Desplazamiento químico (± 0.01 ppm), multiplicidad y constantes de acoplamiento de las resonancias de los protones NH y OH en el espectro de ^1H -RMN de la glico-oligoamida catiónica 2 y el modelo 5 en $\text{H}_2\text{O}:\text{acetona-}d_6$ (90:10) a -15°C . Referencia TSP- d_4 a 0.00ppm.

		$\beta\text{-D-xil-Py-}\gamma[\text{R}(\text{NH}_3^+)]\text{-Py-Ind}$ 2	$\beta\text{-D-xil-Py-NHAc}$ 5
PROTONES NH	NH1	11.07 (s)	-
	NH2	10.21 (s.a.)	-
	NH4	10.04 (s.a.)	10.01 (s)
	NH5	8.50 (d, $J = 9.2$ Hz)	8.93 (d, $J = 8.8$ Hz)
	NH3	8.21 (s.a.)	-
PROTONES OH	OH3	-	6.69 (s.a.)
	OH2	-	6.63 (s.a.)
	OH4	-	6.52 (s.a.)

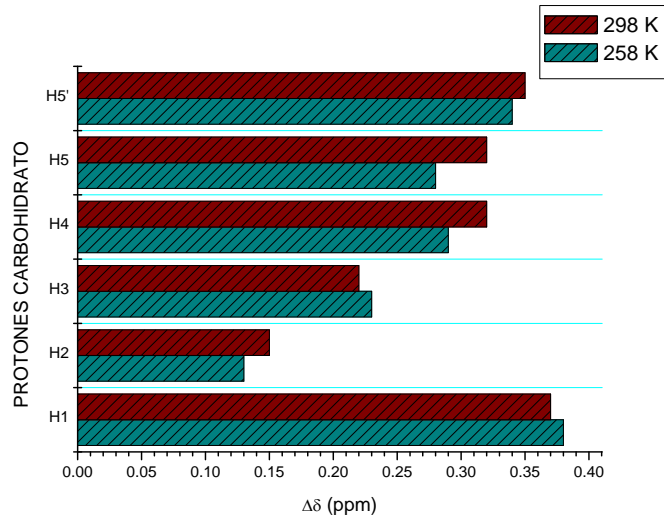


Figura 1 Gráfica donde se representan la comparación de las diferencias de desplazamientos químicos entre los espectros de ^1H -RMN de $\beta\text{-D-xil-Py-}\gamma\text{[(R)NH}_3^+\text{]-Py-Ind}$ (2) y $\beta\text{-D-xil-Py-NHAc}$ (5) a 25 °C D_2O (color granate) y a -15 °C $\text{H}_2\text{O/acetona-d}_6$ (color turquesa).

Tabla 8 Variación de los desplazamientos químicos (± 0.01 ppm) de los protones aromáticos con la temperatura de la glico-oligoamida catiónica 2. Espectros ^1H -RMN realizados en H_2O : acetona- d_6 (90:10). Referencia TSP-d4 a 0.00ppm.

T (K)	Ind-4	Ind-7	Ind-6	Ind-5	Ind-3	Py-5 ^A	Py-5 ^B	Py-3 ^B	Py-3 ^A
258	7.77	7.57	7.37	7.21	7.2	7.13	6.89	6.68	6.66
263	7.77	7.58	7.38	7.21	7.21	7.13	6.9	6.7	6.68
268	7.78	7.58	7.38	7.22	7.22	7.14	6.9	6.71	6.69
273	7.78	7.59	7.38	7.22	7.22	7.15	6.91	6.73	6.7
$\Delta\delta$ (ppm)	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.05	0.04

Tabla 9 Variación de los desplazamientos químicos (± 0.01 ppm) de los protones del carbohidrato con la temperatura de la glico-oligoamida catiónica 2. Espectros ^1H -RMN realizados en H_2O : acetona- d_6 (90:10). Referencia TSP-d4 a 0.00ppm.

T (K)	δ H1	δ H2	δ H3	δ H4	δ H5	δ H5'
258	4.63	3.41	3.31	3.36	3.67	3.11
263	4.67	3.42	3.33	3.33	3.69	3.13
268	4.7	3.43	3.35	3.35	3.71	3.15
273	4.73	3.44	3.37	3.4	3.73	3.17
$\Delta\delta$ (ppm)	0.1	0.03	0.06	0.04	0.06	0.06

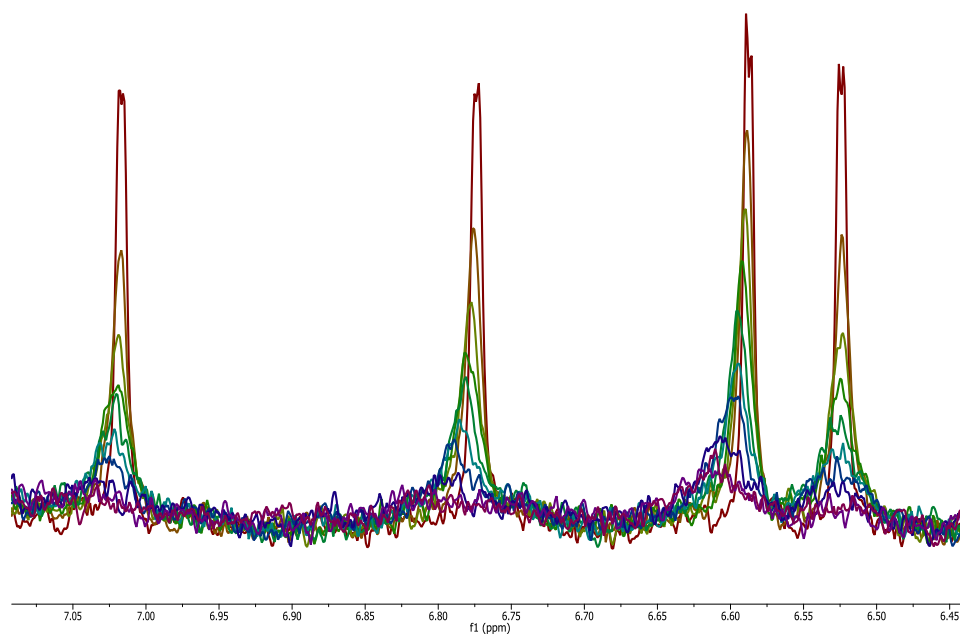


Figura 2 Ampliación de la región espectral de la zona aromática de los espectros ^1H -RMN superpuestos de la glico-oligoamidas de xilosa neutra con diferentes concentraciones de $\text{Poly}(\text{dA-dT})_2$. Espectros en D_2O , tampón fosfato 10 mM, $\text{pH}=7.3$, a 25°C . Se observa la variación de los desplazamientos químicos.

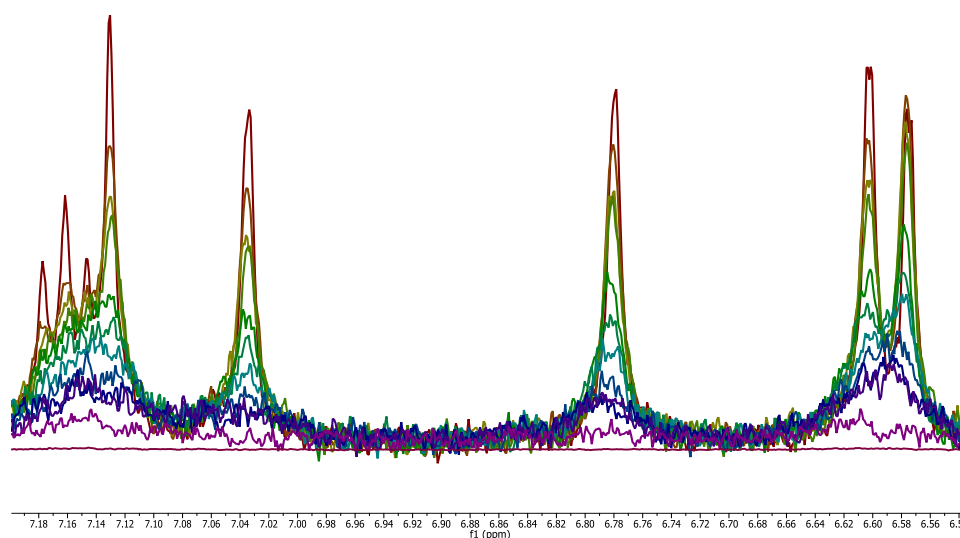


Figura 3 Ampliación de la región espectral de la zona aromática de los espectros ^1H -RMN superpuestos de la glico-oligoamidas de xilosa catiónica con diferentes concentraciones de $\text{Poly}(\text{dA-dT})_2$. Espectros en D_2O , tampón fosfato 10 mM, $\text{pH}=7.3$, a 25°C

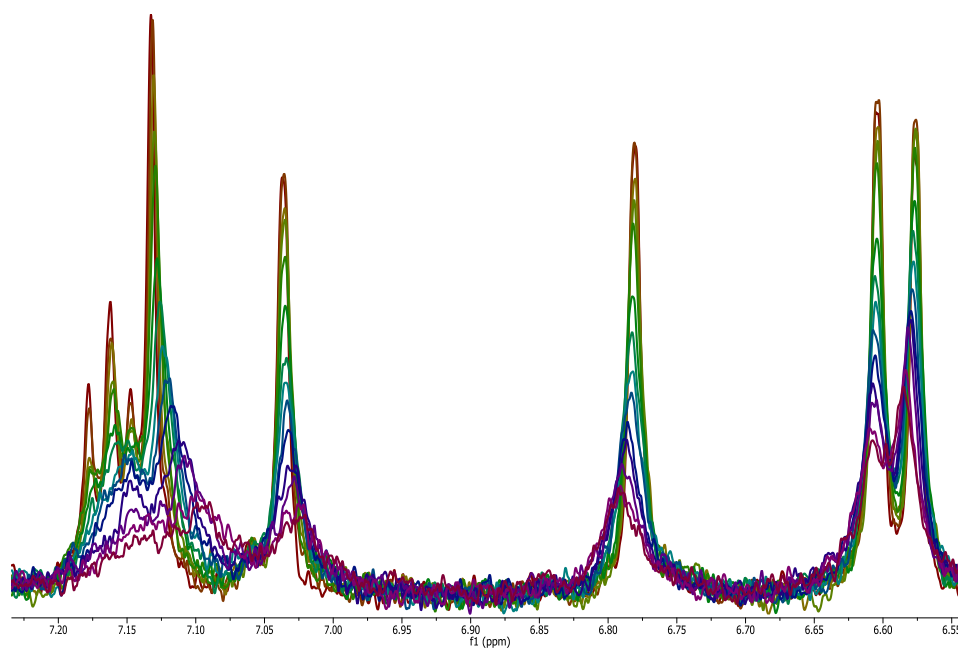


Figura 4 Ampliación de la región espectral de la zona aromática de los espectros ^1H -RMN superpuestos de la glico-oligoamidas de xilosa catiónica **2** con diferentes concentraciones de Poly(dG-dC)_2 . Espectros en D_2O , tampón fosfato 10 mM, $\text{pH}=7.3$, a 25°C . Se observa la variación de los desplazamientos químicos.

Experimento TR-NOESY de β -D-xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) con Poly(dA-dT)₂ en H₂O a 5 °C.

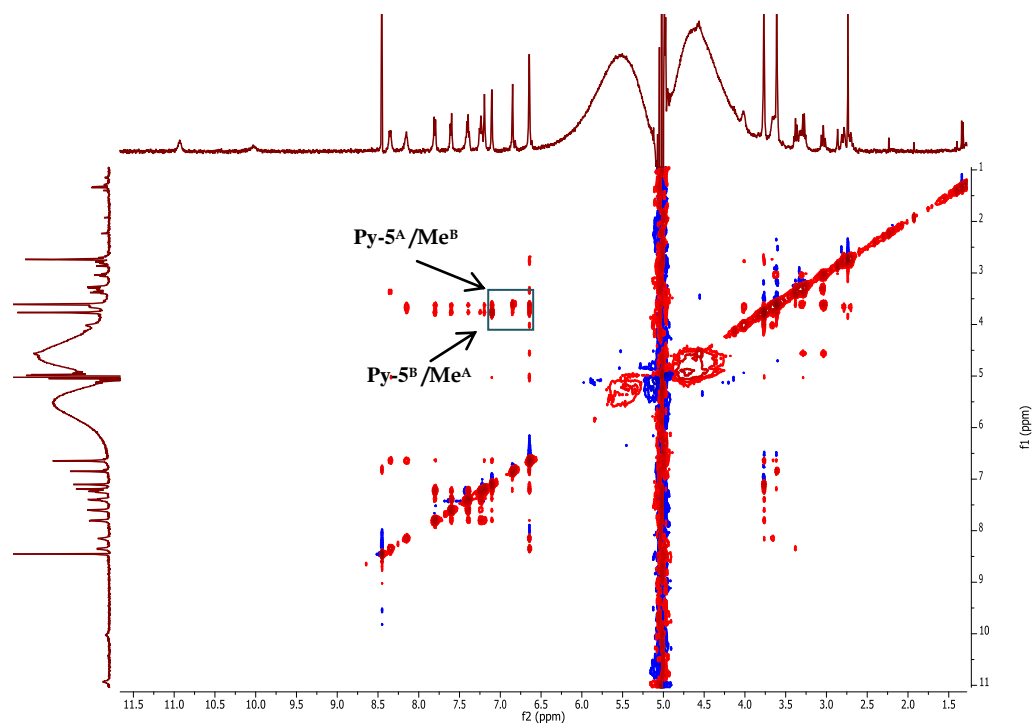


Figura 5 Espectro tr-NOESY de β -D-xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) [300 μ M] con Poly(dA-dT)₂ en H₂O a 5 °C con un T_m = 200ms. (Relación ligando/DNA = 1/0.05)

Experimento TR-NOESY de β -D-xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) con Poly(dG-dC)₂ en D₂O a 25

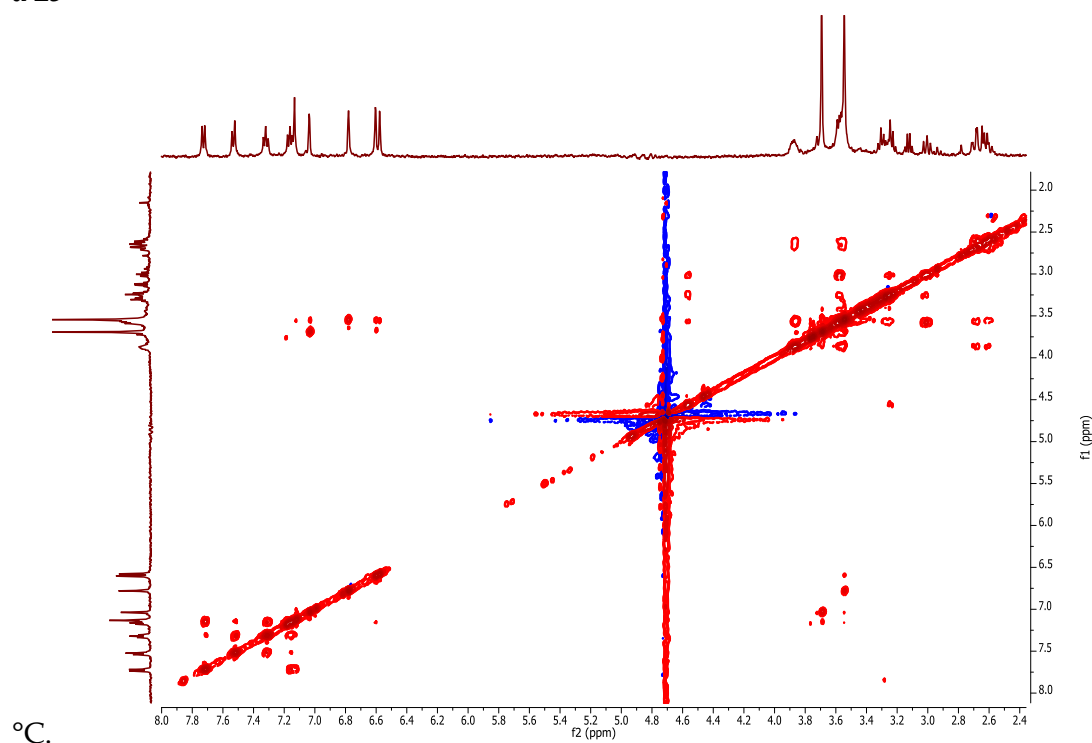


Figura 6 Espectro TR-NOESY de β -D-xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (**2**) [210 μ M] con Poly(dG-dC)₂ en D₂O a 25 °C con un T_m = 200ms. (Relación ligando/DNA = 1/0.1)

Experimentos STD control (blancos) de la glico-oligoamida catiónica de xilosa **2** en ausencia de ADN.

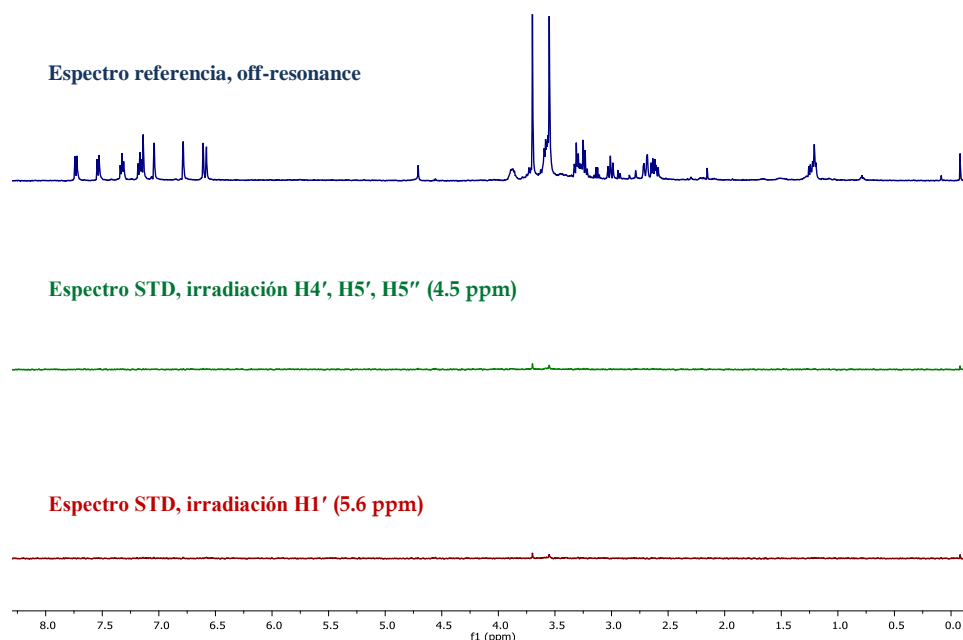


Figura 7 Espectros DF-STD control de β -D-xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind ([L] = 175 μ M) en ausencia de ADN, en D₂O, tampón fosfato a 25 °C. Espectro referencia con irradiación off-resonance, espectro azul. Espectro STD irradiando a los protones H4', H5', H5'' de la desoxirribosa (región externa ADN), espectro verde. Espectro STD irradiando al protón H1' de la desoxirribosa (región interna ADN), espectro rojo.

Tablas con los valores de STD con Poly(dA-dT)₂

Tabla 10 Datos obtenidos de los experimentos STD de β -D-xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) con Poly(dA-dT)₂ irradiando a 5.6 ppm. Los valores de las columnas Blanco y STD, corresponden a los valores de intensidades medidas del experimento control y del espectro STD respectivamente. El STD real se obtiene de la resta de ambas intensidades. El epítipo se obtiene del cálculo $I_{STD}/I_{STD\ max} \times 100$.

	L6=8		ZONA IRRADIADA: 5,6 (DENTRO)	
SEÑAL	BLANCO	STD	REAL STD	EPÍTOPO (% STD)
Ind-4	1,37	11,2	9,83	87
Ind-7	1,83	11,2	9,37	83
Ind-6	1,64	11,2	9,56	85
Ind-5	2	12,3	10,3	91
Ind-3	2,2	13,5	11,3 ^a	100
Py-5 ^A	3,56	11,2	7,64	68
Py-5 ^B	3,23	10,2	6,97	62
Py-3 ^B	2,2	13,5	11,3 ^a	100
Py-3 ^A	3,56	10,2	6,64	59
H1	_b	_b	_b	_b
γ^b	2,43	7,63	5,2	46
Me ^A	3,56	8,39	4,83	43
H5 + γ^a	2,67	6,3	3,63	32
Me ^B	2,67	6,3	3,63	32
H2	1,66	4,73	3,07	27
H3	1,66	5,21	3,55	31
H4	1,66	4,73	3,07	27
H5'	1,66	3,91	2,25	20
γ^c	2	8,39	6,39	57
$\gamma^{c'}$	2	9,22	7,22	64

^a En rojo las señales que muestran el valor máximo de saturación. ^b La supresión de la señal del agua elimina también la señal del protón anomérico del carbohidrato.

Tabla 11 Datos obtenidos de los experimentos STD de β -D-xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) con Poly(dA-dT)₂ irradiando a 4.5 ppm. Los valores de las columnas Blanco y STD, corresponden a los valores de intensidades medidas del experimento control y del espectro STD respectivamente. El STD real se obtiene de la resta de ambas intensidades. El epítopo se obtiene del cálculo $I_{STD}/I_{STD\ max} \times 100$.

L6=8		ZONA IRRADIADA: 4,5 (FUERA)		
SEÑAL	BLANCO	STD	REAL STD	EPÍTOPO (% STD)
Ind-4	1,5	13,5	12	99
Ind-7	1,5	10,15	8,65	71
Ind-6	1,5	9,22	7,72	64
Ind-5	1,37	11,12	9,75	80
Ind-3	1,37	13,5	12,13 ^a	100
Py-5 ^A	0,085	10,15	10,07	83
Py-5 ^B	2,43	11,12	8,69	72
Py-3 ^B	2,43	13,5	11,07	91
Py-3 ^A	2,43	11,12	8,69	72
H1	└ ^b	└ ^b	└ ^b	└ ^b
γ^b	5,21	13,5	8,29	68
Me ^A	3,56	13,5	9,94	82
H5 + γ^a	3,55	11,12	7,57	62
Me ^B	2,94	10,15	7,21	59
H2	2,67	12,28	9,61	79
H4	2,67	8,39	5,72	47
H3	2,67	13,5	10,83	89
H5'	2,94	14,86	11,92	98
γ^c	3,55	9,23	5,68	47
$\gamma^{c'}$	3,55	10,15	6,6	54

^a En rojo las señales que muestran el valor máximo de saturación. ^b La supresión de la señal del agua elimina también la señal del protón anomérico del carbohidrato.

Tabla 12 Parámetro numérico que define la orientación del ligando para el caso de β -D-xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) con Poly(dA-dT)₂. La primera columna, valores obtenidos del cociente de los % STD normalizados obtenidos de la irradiación a 4.5 ppm (fuera) y a 5.6 ppm (dentro). La segunda columna, valores obtenidos del cociente de las intensidades sin normalizar.

SEÑAL	%STD _f / %STD _d	ORIENTACIÓN
		I _{fuera} /I _{dentro}
Ind-4	1,14	1,22
Ind-7	0,86	0,92
Ind-6	0,75	0,81
Ind-5	0,88	0,95
Ind-3	1	1,07
Py-5 ^A	1,23	1,32
Py-5 ^B	1,16	1,25
Py-3 ^B	0,91	0,98
Py-3 ^A	1,22	1,31
γ^b	1,49	1,59
Me ^A	1,92	2,06
H5 + γ^a	1,94	2,09
Me ^B	1,85	1,99
H2	2,92	3,13
H3	3,29	3,05
H4	1,74	1,86
H5'	4,94	5,30
γ^c	0,83	0,89
$\gamma^{c'}$	0,85	0,91

DF-STD con Poly(dG-dC)₂

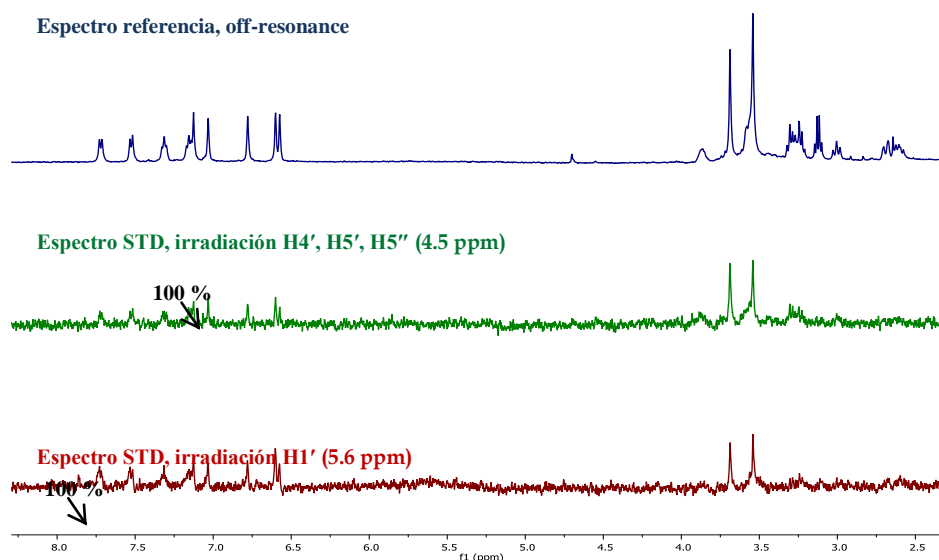


Figura 8 Espectros DF-STD del complejo β -D-xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind/Poly(dG-dC)₂ (relación molar 1/0.1, [L] = 160 μ M) en D₂O, tampón fosfato a 25 °C. Espectro referencia con irradiación off-resonance, espectro azul. Espectro STD (ampliado 5 \times) irradiando a los protones H4', H5', H5'' de la desoxirribosa (región externa ADN), espectro verde. Espectro STD (ampliado 5 \times) irradiando al protón H1' de la desoxirribosa (región interna ADN), espectro rojo. En ambos espectros se marca con el 100%, aquellas señales que presentan la máxima saturación, Ind-3.

Tabla 13 Datos obtenidos de los experimentos STD de β -D-xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) con Poly(dG-dC)₂ irradiando a 5.6 ppm. Los valores de las columnas Blanco y STD, corresponden a los valores de intensidades medidas del experimento control y del espectro STD respectivamente. El STD real se obtiene de la resta de ambas intensidades. El epítipo se obtiene del cálculo $I_{STD}/I_{STD\ max} \times 100$.

	L6=8 ZONA IRRADIADA: 5,6 (DENTRO)			
SEÑAL	BLANCO	STD	REAL STD	EPÍTOPO (% STD)
Ind-4	1,37	11,8	10,43	100
Ind-7	1,83	10,7	8,87	85
Ind-6	1,64	11,8	10,16	97
Ind-5	2	10,7	8,7	83
Ind-3	2,2	8,06	5,86	56
Py-5 ^A	3,56	8,87	5,31	51
Py-5 ^B	3,23	8,87	5,64	54
Py-3 ^B	2,2	11,8	9,6	92
Py-3 ^A	3,56	7,33	3,77	36
H1	└b	└b	└b	└b
γ^b	2,43	3,76	1,33	13
Me ^A	3,56	6,66	3,1	30
H5 + γ^a	2,67	3,11	0,44	4
Me ^B	2,67	6,06	3,39	33
H2	1,66	3,76	2,1	20
H3	1,66	5,51	3,85	37
H4	1,66	3,76	2,1	20
H5'	1,66	4,14	2,48	24
γ^c	2	6,66	4,66	45
$\gamma^{c'}$	2	8,87	6,87	66

^a En rojo las señales que muestran el valor máximo de saturación. ^b La supresión de la señal del agua elimina también la señal del protón anomérico del carbohidrato.

Tabla 14 Datos obtenidos de los experimentos STD de β -D-xil-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) con Poly(dG-dC)₂ irradiando a 4.5 ppm. Los valores de las columnas Blanco y STD, corresponden a los valores de intensidades medidas del experimento control y del espectro STD respectivamente. El STD real se obtiene de la resta de ambas intensidades. El epítipo se obtiene del cálculo $I_{STD}/I_{STD\ max} \times 100$.

L6=8		ZONA IRRADIADA: 4,5 (FUERA)		
SEÑAL	BLANCO	STD	REAL STD	EPÍTOPO (% STD)
Ind-4	1,5	7,63	6,13	67
Ind-7	1,5	9,23	7,73	85
Ind-6	1,5	9,23	7,73	85
Ind-5	1,37	9,23	7,86	86
Ind-3	1,37	7,63	6,26	68
Py-5 ^A	0,085	9,23	9,15	100
Py-5 ^B	2,43	6,93	4,5	49
Py-3 ^B	2,43	8,39	5,96	65
Py-3 ^A	2,43	5,73	3,3	36
H1	└b	└b	└b	└b
γ^b	5,21	11,2	5,99	66
Me ^A	3,56	8,39	4,83	53
H5 + γ^a	3,55	6,93	3,38	37
Me ^B	2,94	6,3	3,36	37
H2	2,67	8,39	5,72	63
H4	2,67	6,93	4,26	47
H3	2,67	8,39	5,72	63
H5'	2,94	9,23	6,29	69
γ^c	3,55	5,21	1,66	18
$\gamma^{c'}$	3,55	7,63	4,08	45

^a En rojo las señales que muestran el valor máximo de saturación. ^b La supresión de la señal del agua elimina también la señal del protón anomérico del carbohidrato.

Tabla 15 Parámetro numérico que define la orientación del ligando para el caso de β -D-xil-Py- χ (R)NH₃⁺]-Py-Ind (2) con Poly(dG-dC)₂. La primera columna, valores obtenidos del cociente de los % STD normalizados obtenidos de la irradiación a 4.5 ppm (fuera) y a 5.6 ppm (dentro). La segunda columna, valores obtenidos del cociente de las intensidades sin normalizar.

SEÑAL	%STD _f / %STD _d	ORIENTACIÓN
		I _{fuera} /I _{dentro}
Ind-4	0,67	0,59
Ind-7	0,99	0,87
Ind-6	0,87	0,76
Ind-5	1,03	0,90
Ind-3	1,22	1,07
Py-5 ^A	1,96	1,72
Py-5 ^B	0,91	0,80
Py-3 ^B	0,71	0,62
Py-3 ^A	1,00	0,88
γ^b	5,14	4,50
Me ^A	1,78	1,56
H5 + γ^a	8,76	7,68
Me ^B	1,13	0,99
H2	3,11	2,72
H3	1,26	1,11
H4	3,11	2,72
H5'	2,89	2,54
γ^c	0,41	0,36
$\gamma^{c'}$	0,68	0,59

ANEXO CAPÍTULO 5

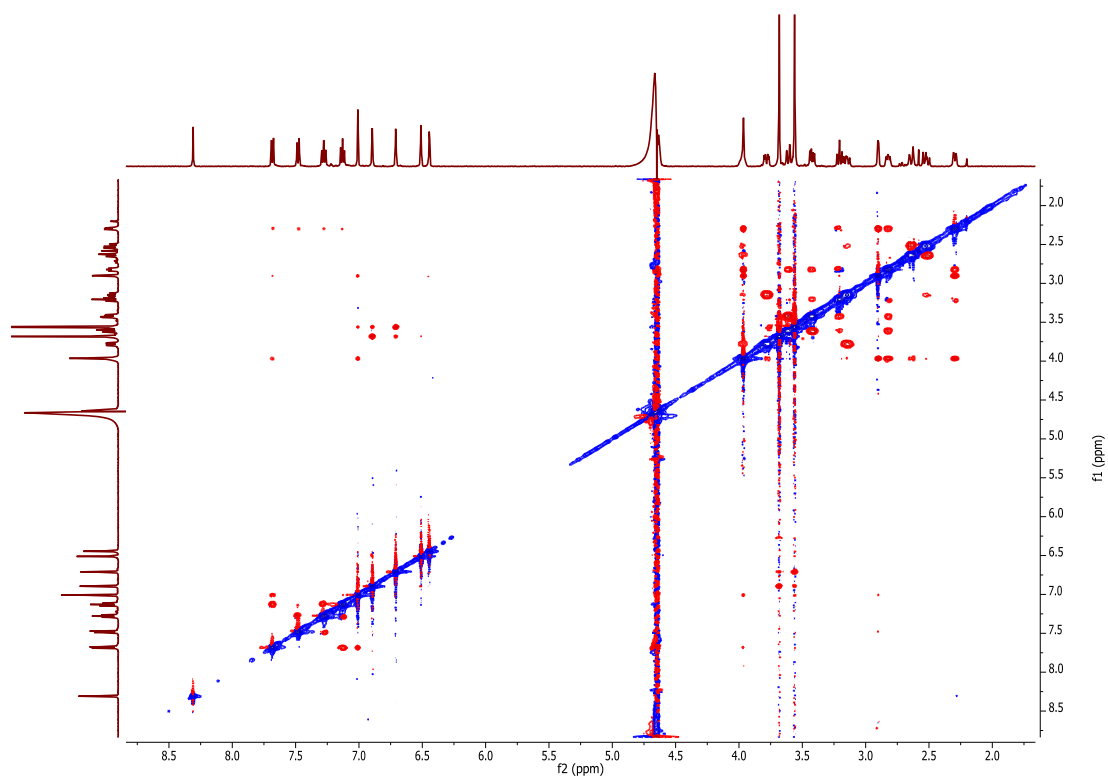


Figura 1 Espectro ROESY de β -D-man-Py-[(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) en D₂O a 25 °C

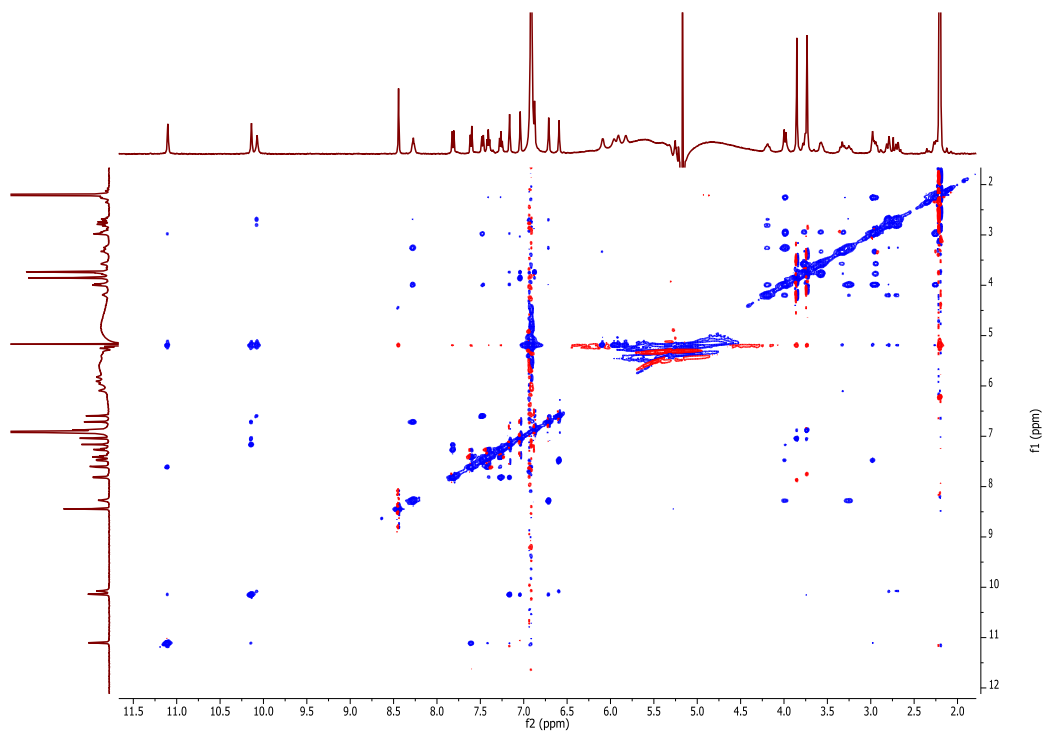


Figura 2 Espectro NOESY de β -D-man-Py-[(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) en H₂O/acetona (90:10) a -15 °C

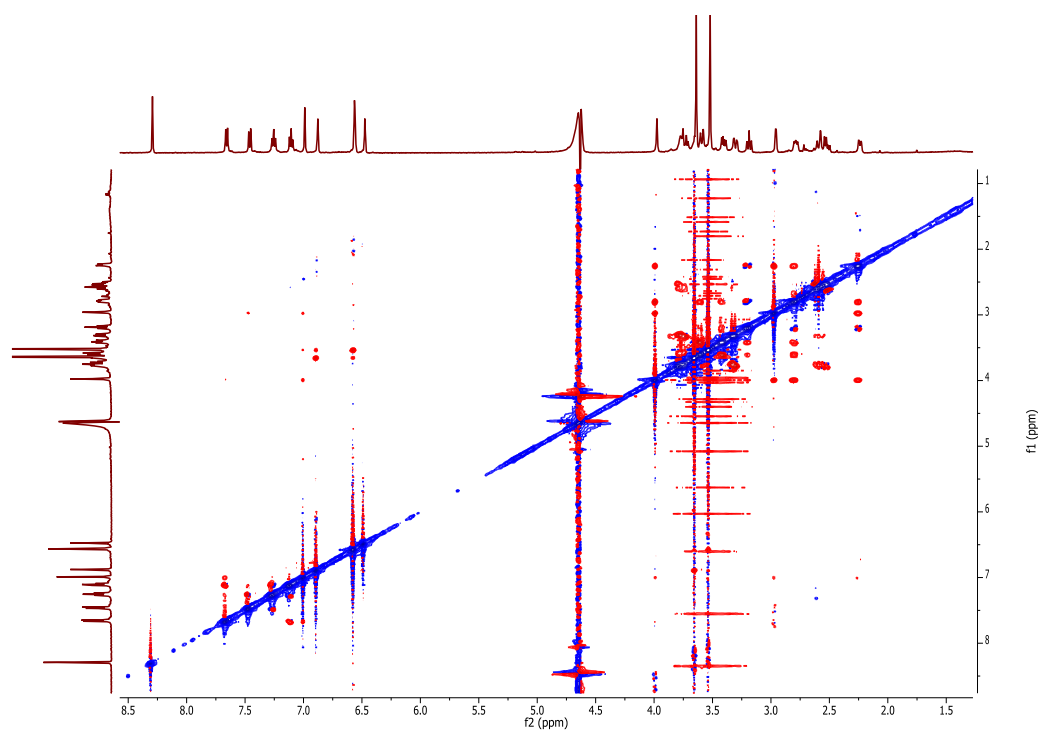


Figura 3 Espectro ROESY de β -L-man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) en D₂O a 25 °C

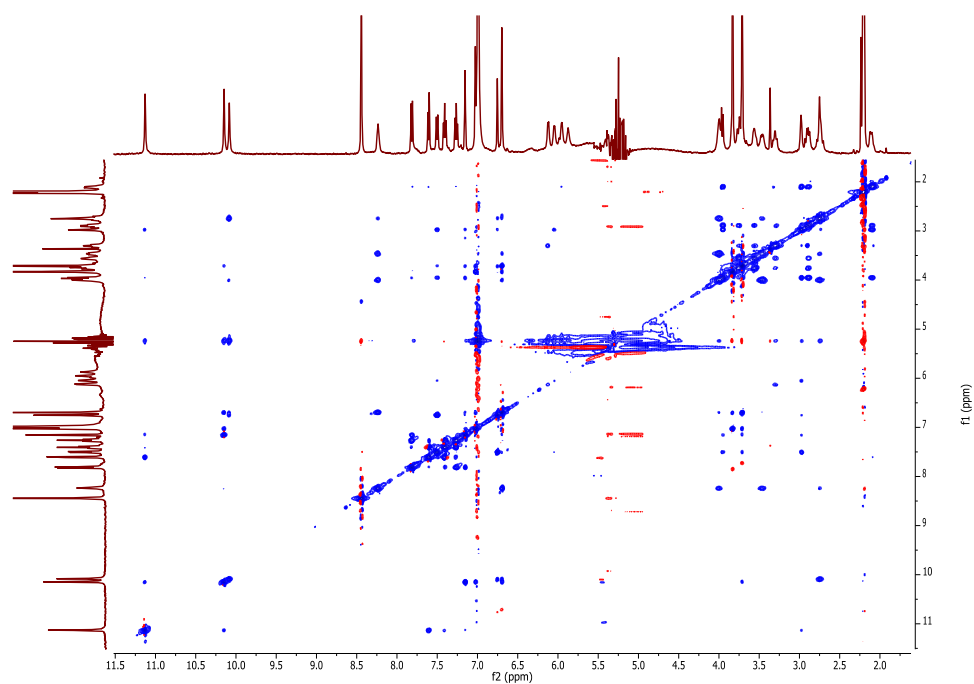


Figura 4 Espectro NOESY de β -L-man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) en H₂O/acetona (90:10) a -15 °C

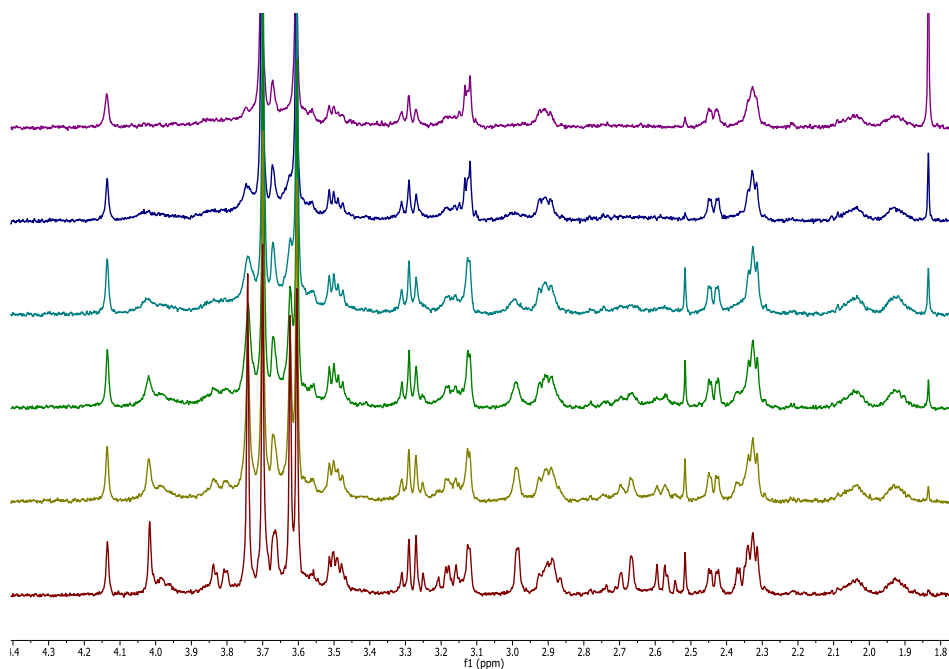


Figura 5 Ampliación de la zona del carbohidrato de los espectros ^1H -RMN del experimento de competición de las glico-oligoamidas $\beta\text{-D-Man-Py-}\gamma(\text{R})\text{NH}_3^+\text{-Py-Ind}$ (3) y su análoga neutra $\beta\text{-D-Man-Py-}\gamma\text{-Py-Ind}$ frente a Poly(dA-dT)_2 . Espectro en D_2O , tampón fosfato 10 mM, pH=7.3 a 25 °C

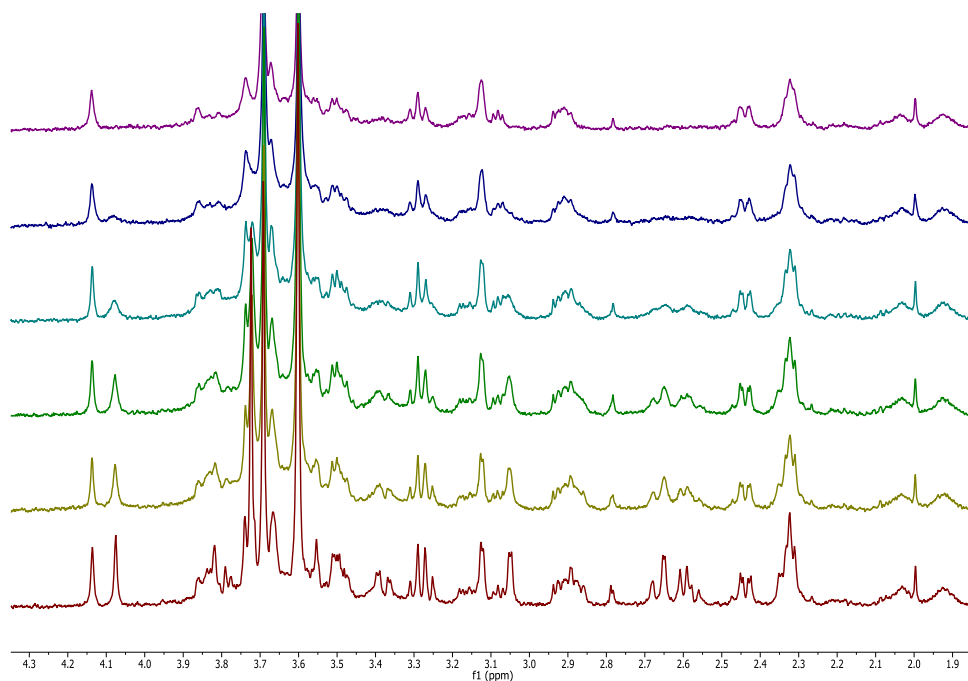


Figura 6 Ampliación de la zona del carbohidrato de los espectros ^1H -RMN del experimento de competición de las glico-oligoamidas $\beta\text{-L-Man-Py-}\gamma(\text{R})\text{NH}_3^+\text{-Py-Ind}$ (4) y su análoga neutra $\beta\text{-L-Man-Py-}\gamma\text{-Py-Ind}$ frente a Poly(dA-dT)_2 . Espectro en D_2O , tampón fosfato 10 mM, pH=7.3 a 25 °C

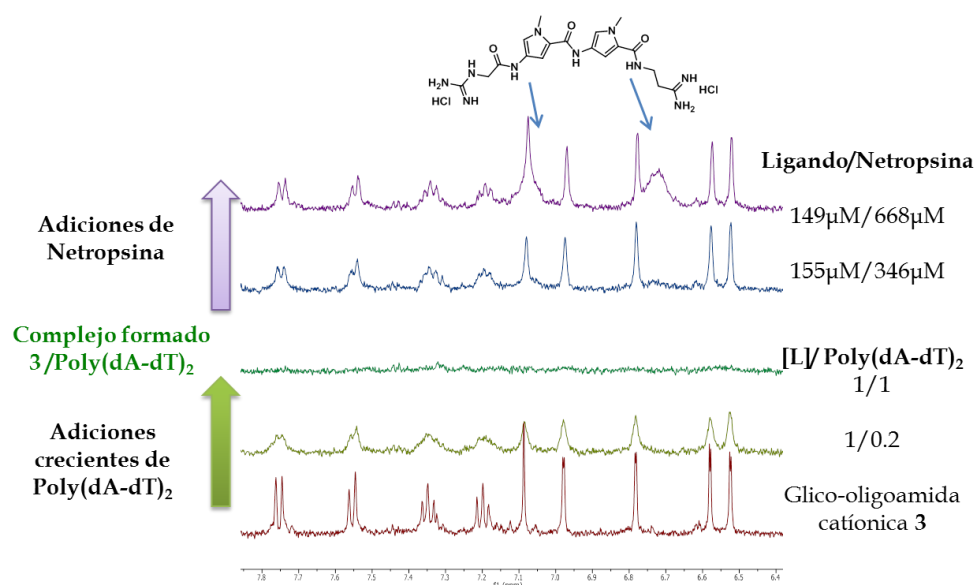


Figura 7 Experimento de competición entre la glico-oligoamida catiónica 3 derivada de D-manosa y la netropsina con poly(dA-dT)_2 . Espectro en D_2O , tampón fosfato 10 mM, $\text{pH}=7.3$ a 25°C

Experimentos tr-NOESY de $\beta\text{-D-man-Py-}\gamma[(\text{R})\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind (3)}$ con Poly(dA-dT)_2

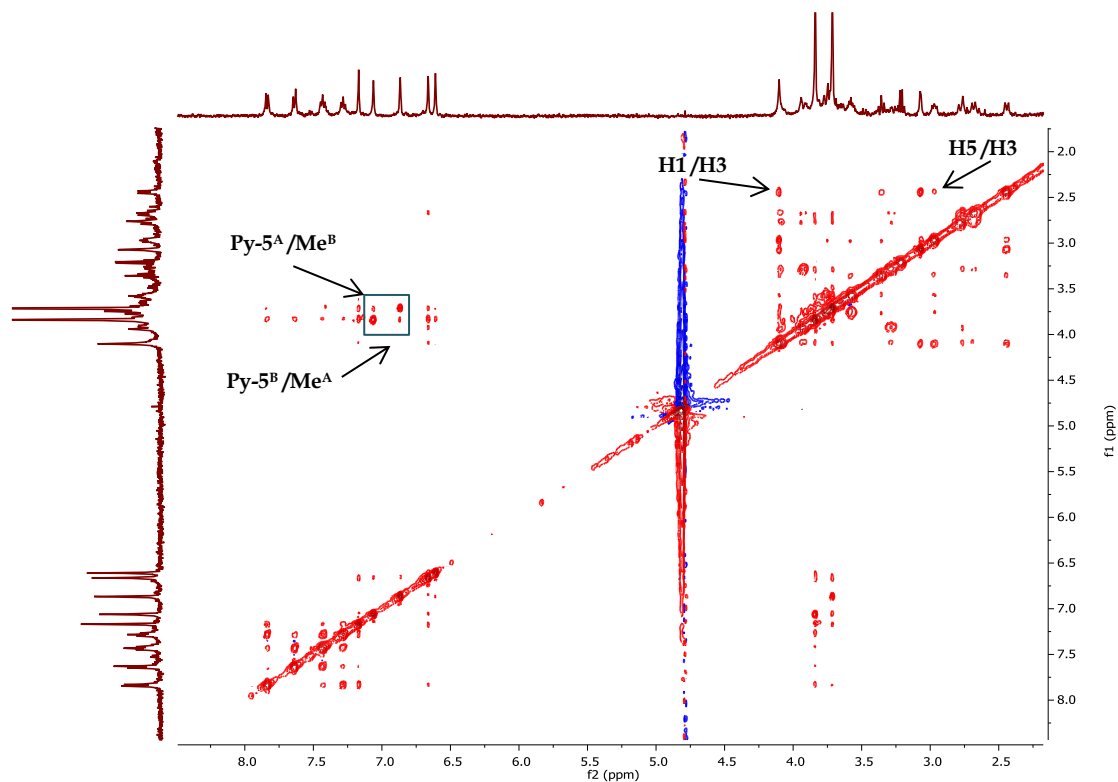


Figura 8 Espectro tr-NOESY de $\beta\text{-D-man-Py-}\gamma[(\text{R})\text{NH}_3^+]\text{-Py-Ind (3)}$ [$200\ \mu\text{M}$] con Poly(dA-dT)_2 en D_2O a 25°C con un $T_m=200\text{ms}$. (Relación ligando/ $\text{Poly(dA-dT)}_2 = 1/0.05$)

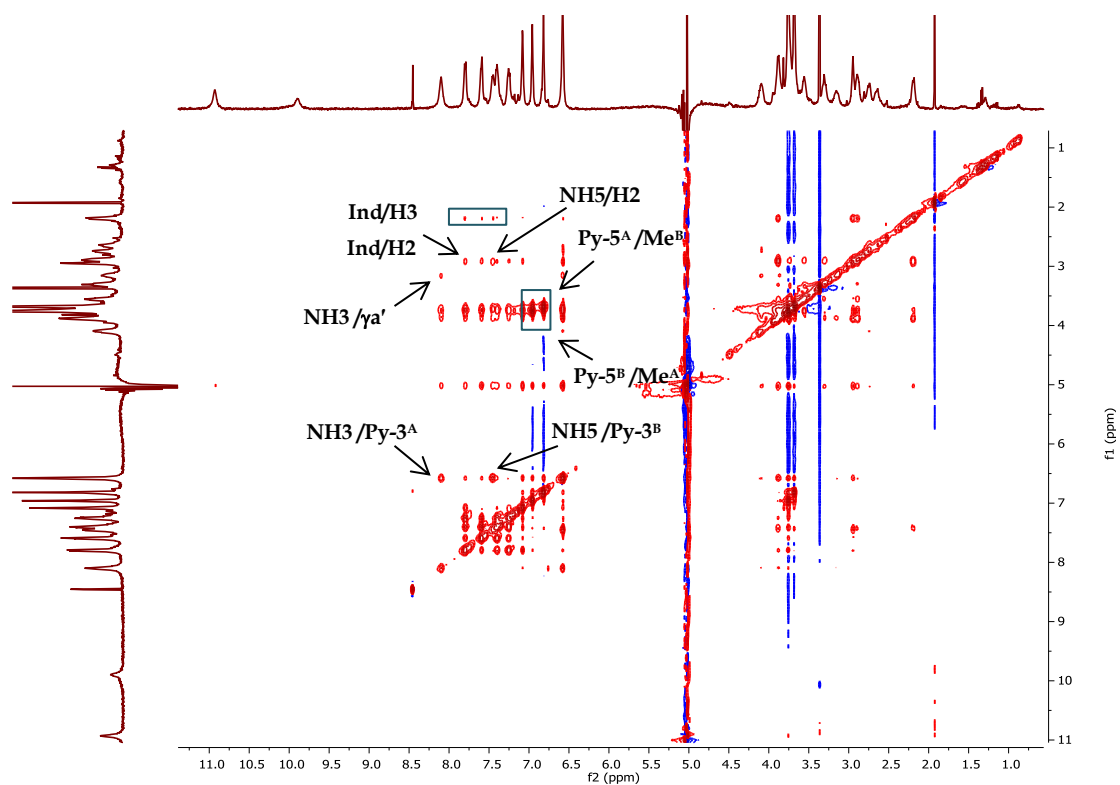


Figura 9 Espectro *tr*-NOESY de β -D-man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) [350 μ M] con Poly(dA-dT)₂ en H₂O a 5 °C con un T_m = 200ms. (Relación ligando/ Poly(dA-dT)₂ = 1/0.05)

Experimentos *tr*-NOESY de β -L-man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) con Poly(dA-dT)₂

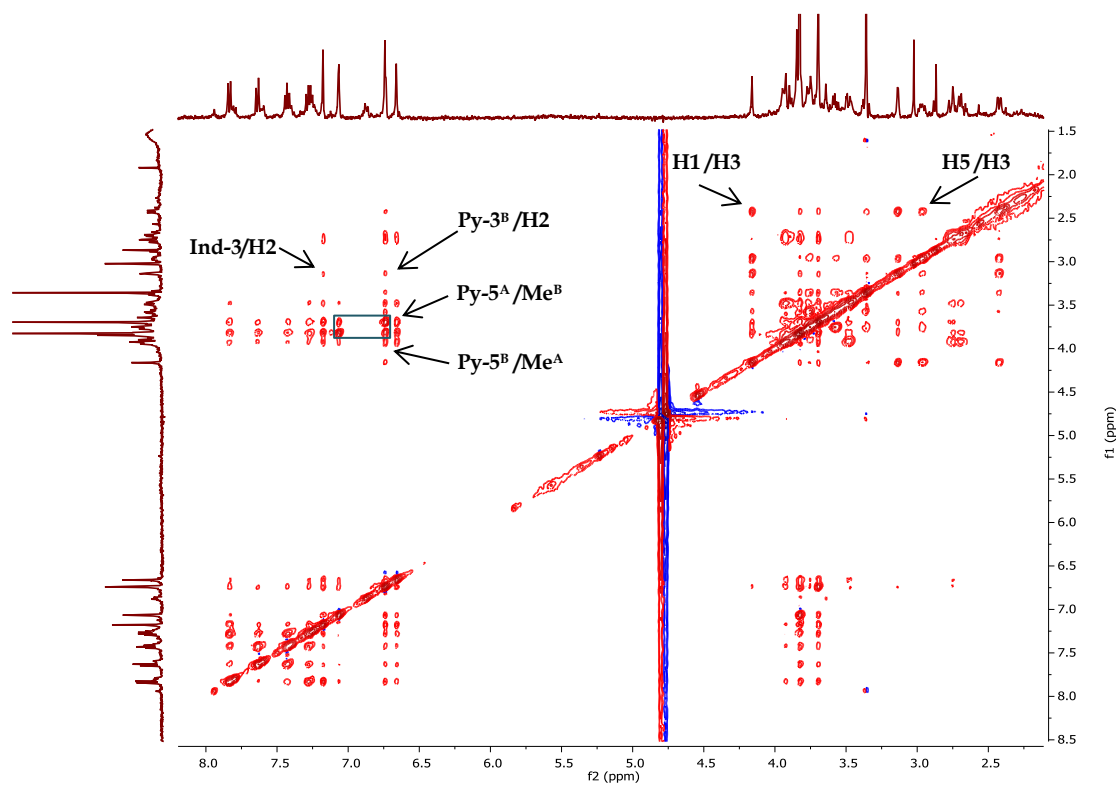


Figura 10 Espectro *tr*-NOESY de β -L-man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) [220 μ M] con Poly(dA-dT)₂ en D₂O a 25 °C con un T_m = 200ms. (Relación ligando/ Poly(dA-dT)₂ = 1/0.05)

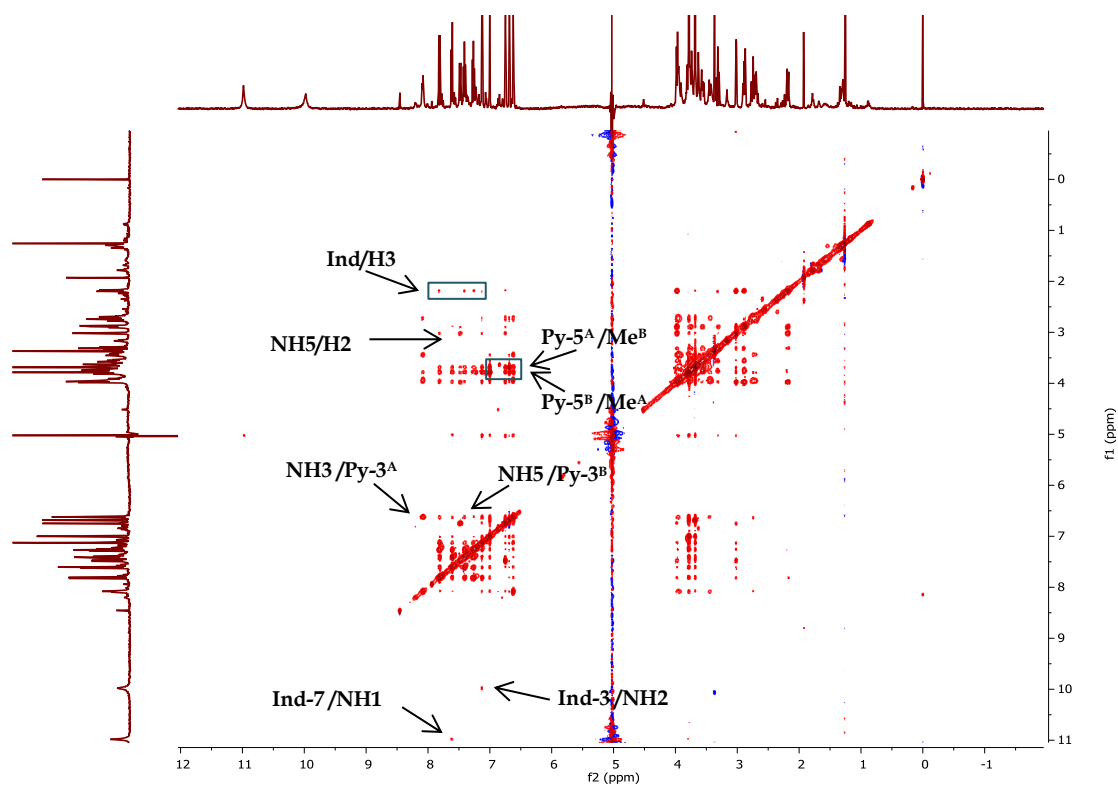


Figura 11 Espectro *tr*-NOESY de β -L-man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) [500 μ M] con Poly(dA-dT)₂ en H₂O a 5 °C con un T_m = 200ms. (Relación ligando/ Poly(dA-dT)₂ = 1/0.05)

Experimentos *tr*-NOESY de β -D-man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) con Poly(dG-dC)₂

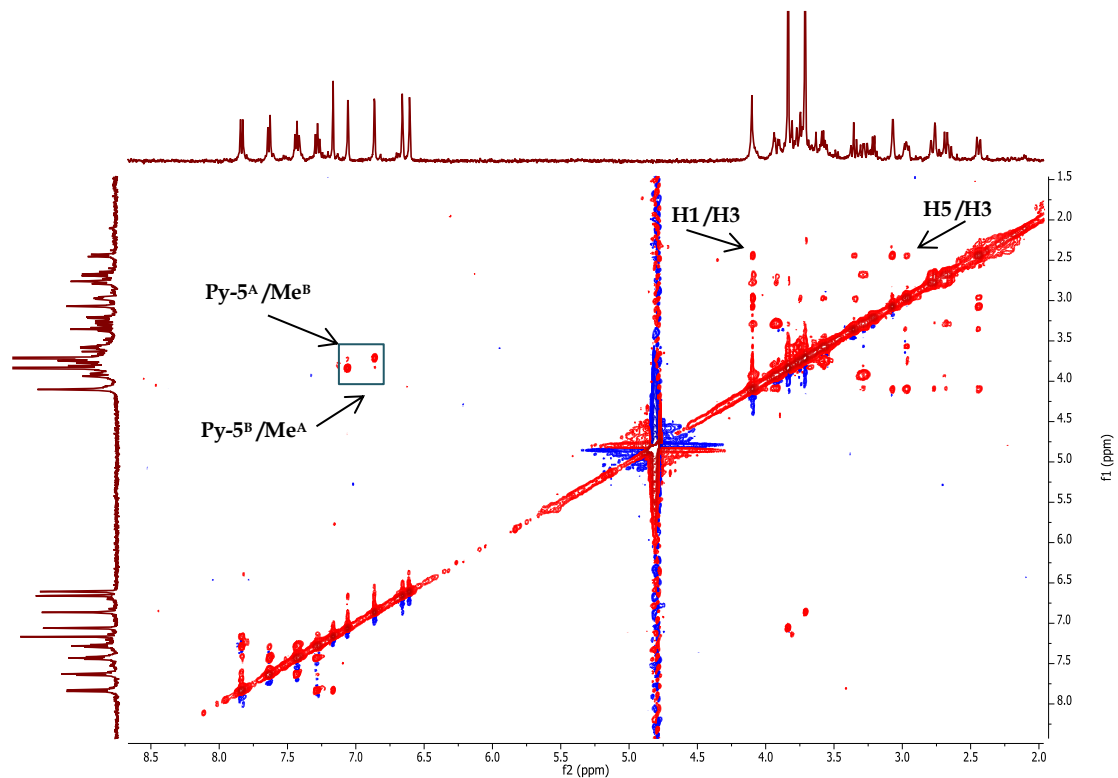


Figura 12 Espectro *tr*-NOESY de β -D-man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) [190 μ M] con Poly(dG-dC)₂ en D₂O a 25 °C con un T_m = 200ms. (Relación ligando/ Poly(dA-dT)₂ = 1/0.15)

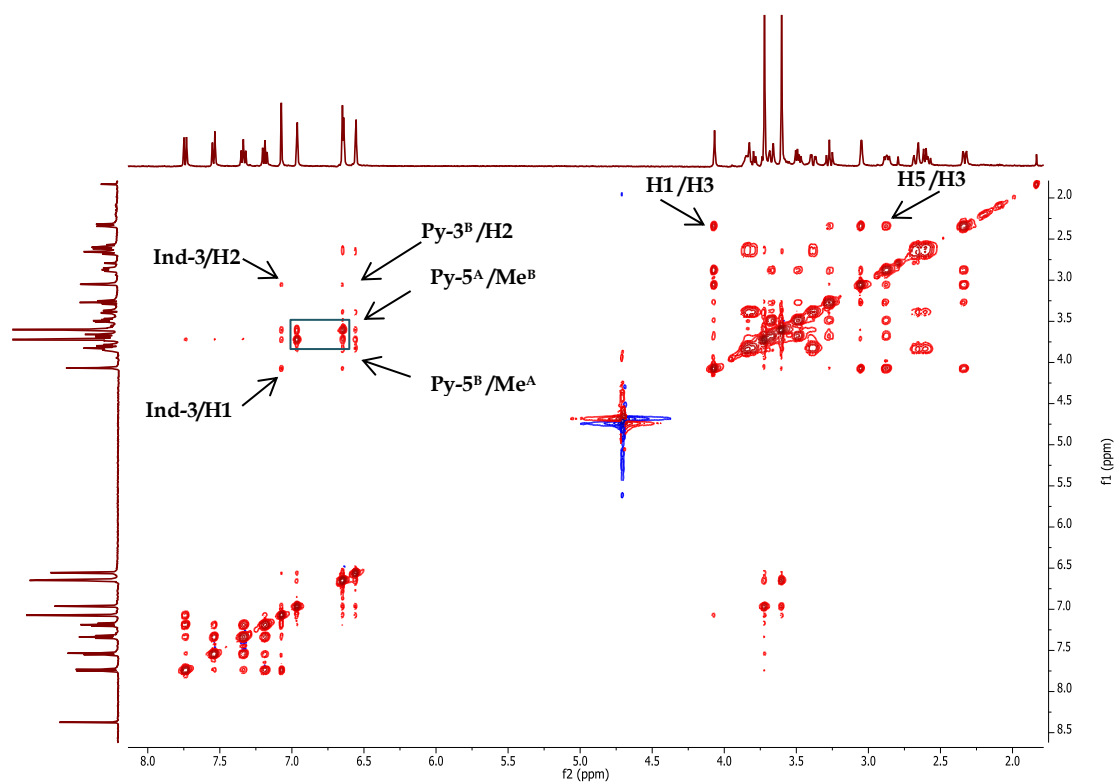
Experimentos tr-NOESY de β -L-man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) con Poly(dG-dC)₂

Figura 13 Espectro tr-NOESY de β -L-man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) [400 μ M] con Poly(dG-dC)₂ en D₂O a 25 °C con un T_m = 200ms. (Relación ligando/ Poly(dA-dT)₂ = 1/0.1)

Experimentos STD control (blancos) de las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa **3** y L-manosa **4** en ausencia de ADN.

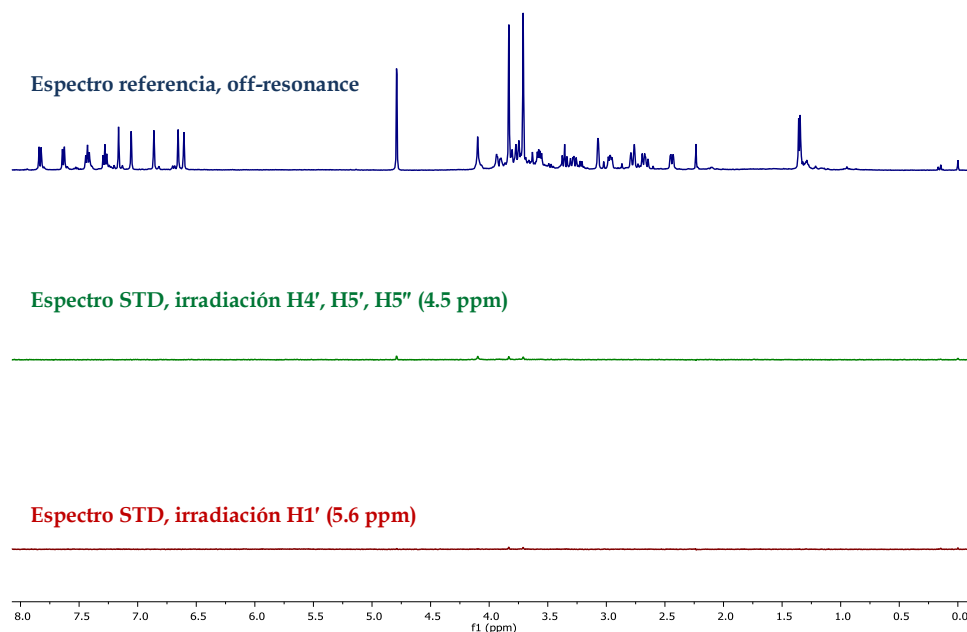


Figura 14 Espectros DF-STD control de β -D-man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind ([L] = 200 μ M) en ausencia de ADN, en D₂O, tampón fosfato a 25 °C. Espectro referencia con irradiación off-resonance, espectro azul. Espectro STD irradiando a los protones H4', H5', H5'' de la desoxirribosa (región externa ADN), espectro verde. Espectro STD irradiando al protón H1' de la desoxirribosa (región interna ADN), espectro rojo.

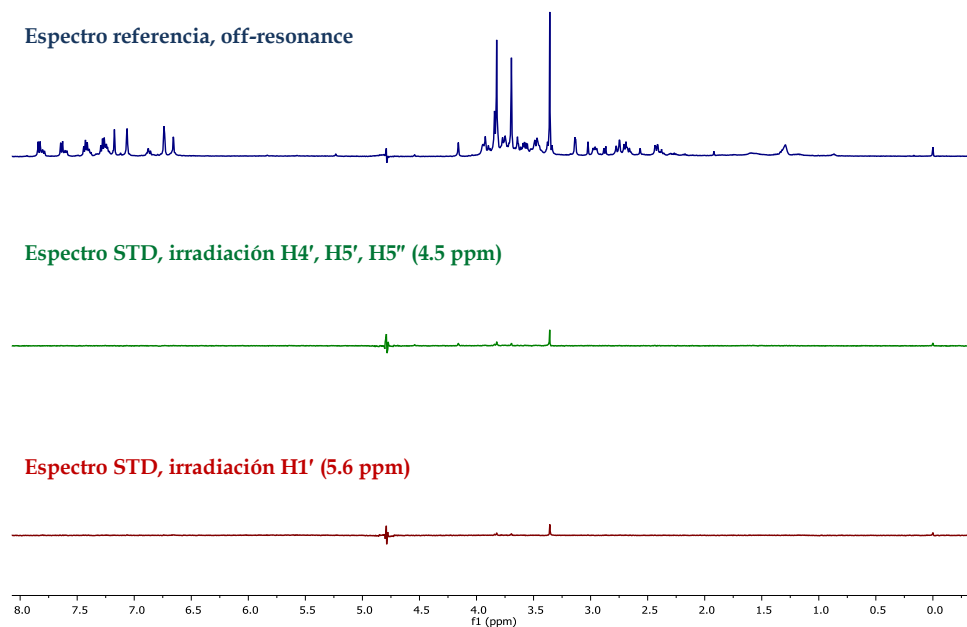


Figura 15 Espectros DF-STD control de β -L-man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind ([L] = 220 μ M) en ausencia de ADN, en D₂O, tampón fosfato a 25 °C. Espectro referencia con irradiación off-resonance, espectro azul. Espectro STD irradiando a los protones H4', H5', H5'' de la desoxirribosa (región externa ADN), espectro verde. Espectro STD irradiando al protón H1' de la desoxirribosa (región interna ADN), espectro rojo.

Experimentos STD de las glico-oligoamidas catiónicas de D-manosa **3** y L-manosa **4** con Poly(dA-dT)₂.

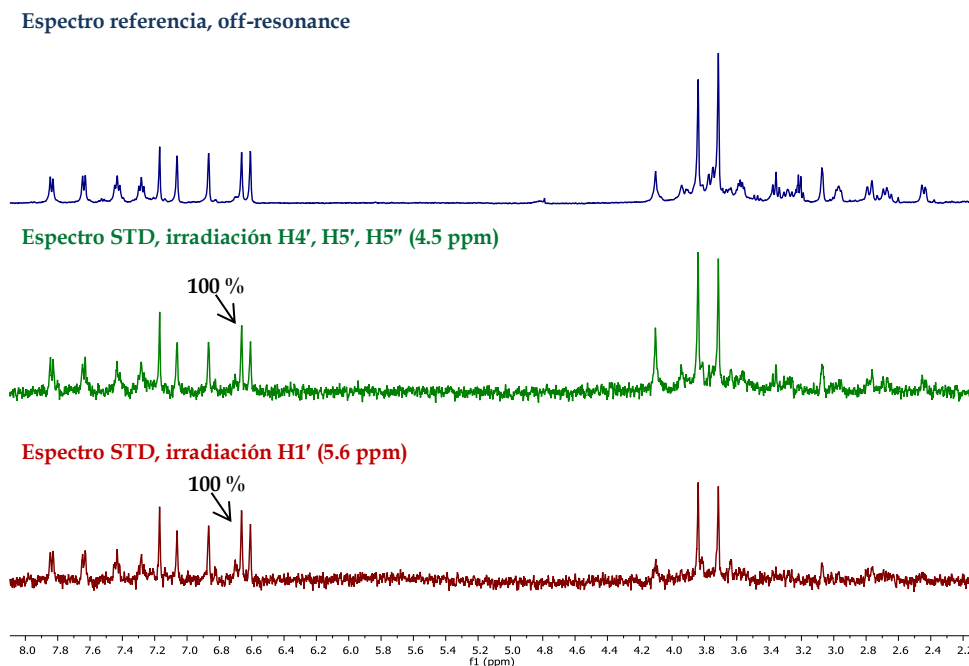


Figura 16 Espectros DF-STD del complejo β -D-man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind/Poly(dA-dT)₂ (relación molar 1/0.05, [L] = 180 μ M) en D₂O, tampón fosfato a 25 °C. Espectro referencia con irradiación off-resonance, espectro azul. Espectro STD (ampliado 10 \times) irradiando a los protones H4', H5', H5'' de la desoxirribosa (región externa ADN), espectro verde. Espectro STD (ampliado 10 \times) irradiando al protón H1' de la desoxirribosa (región interna ADN), espectro rojo. En ambos espectros se marca con el 100%, aquellas señales que presentan la máxima saturación, Py-3^A.

Tablas con los valores de STD con Poly(dA-dT)₂

Tabla 1 Datos obtenidos de los experimentos STD de β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) con Poly(dA-dT)₂ irradiando a 5.6 ppm. Los valores de las columnas Blanco y STD, corresponden a los valores de intensidades medidas del experimento control y del espectro STD respectivamente. El STD real se obtiene de la resta de ambas intensidades. El epítipo se obtiene del cálculo $I_{STD}/I_{STD\ max} \times 100$.

	L6=8		ZONA IRRADIADA: 5.6 (DENTRO)	
SEÑAL	BLANCO	STD	REAL STD	EPÍTOPO (% STD)
Ind-4	0.19	9.23	9.05	90
Ind-7	0.19	9.23	9.05	90
Ind-6	0.19	7.63	7.45	74
Ind-5	0.19	7.63	7.45	74
Ind-3	0.19	10.20	10.02	100
Py-5 ^A	0.19	7.63	7.45	74
Py-5 ^B	0.19	7.63	7.45	74
Py-3 ^A	0.19	10.20	10.02	100
Py-3 ^B	0.19	6.93	6.75	67
H1+ γ^b	1.66	4.74	3.08	31
γ^a	1.51	7.63	6.12	61
Me ^A	1.66	5.21	3.55	35
H6'	1.37	3.23	1.86	19
Me ^B	1.37	4.74	3.37	34
H6	1.13	3.91	2.78	28
H4	0.70	3.91	3.21	32
$\gamma^{a'}$	0.70	6.93	6.23	62
H2	0.85	5.21	4.36	44
H5	0.77	6.30	5.53	55
γ^c	0.77	6.30	5.53	55
$\gamma^{c'}$	0.77	6.30	5.53	55
H3	0.94	6.30	5.36	54

Tabla 2 Datos obtenidos de los experimentos STD de β -D-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) con Poly(dA-dT)₂ irradiando a 4.5 ppm. Los valores de las columnas Blanco y STD, corresponden a los valores de intensidades medidas del experimento control y del espectro STD respectivamente. El STD real se obtiene de la resta de ambas intensidades. El epítipo se obtiene del cálculo $I_{STD}/I_{STD\ max} \times 100$.

L6=8		ZONA IRRADIADA: 4.5 (FUERA)		
SEÑAL	BLANCO	STD	REAL STD	EPÍTOPO (% STD)
Ind-4	0.15	9.23	9.08	90
Ind-7	0.15	6.93	6.78	67
Ind-6	0.15	6.93	6.78	67
Ind-5	0.15	8.39	8.24	82
Ind-3	0.15	10.20	10.05	100
Py-5 ^A	0.15	8.39	8.24	82
Py-5 ^B	0.15	8.39	8.24	82
Py-3 ^A	0.15	10.20	10.05	100
Py-3 ^B	0.15	7.63	7.48	74
H1+ γ^b	10.20	16.40	6.20	62
γ^a	3.23	10.20	6.97	69
Me ^A	2.67	8.39	5.72	57
H6'	2.01	5.73	3.72	37
Me ^B	2.01	6.93	4.92	49
H6	2.01	5.73	3.72	37
H4	1.66	6.93	5.27	52
$\gamma^{a'}$	1.51	10.20	8.69	86
H2	1.03	6.30	5.27	52
H5	0.94	8.39	7.45	74
γ^c	0.70	7.63	6.93	69
$\gamma^{c'}$	0.70	7.63	6.93	69
H3	0.58	6.93	6.35	63

Tabla 3 *Parámetro numérico que define la orientación del ligando para el caso de β -D-Man-Py- $\chi(R)NH_3^+$ -Py-Ind (3) con Poly(dA-dT)₂. La primera columna, valores obtenidos del cociente de los % STD normalizados obtenidos de la irradiación a 4.5 ppm (fuera) y a 5.6 ppm (dentro). La segunda columna, valores obtenidos del cociente de las intensidades sin normalizar.*

SEÑAL	%STD _f / %STD _d	ORIENTACIÓN
		I_{fuera}/I_{dentro}
Ind-4	1.00	1.00
Ind-7	0.75	0.75
Ind-6	0.91	0.91
Ind-5	1.11	1.10
Ind-3	1.00	1.00
Py-5 ^A	1.11	1.10
Py-5 ^B	1.11	1.10
Py-3 ^A	1.00	1.00
Py-3 ^B	1.11	1.10
H1+ γ^b	2.01	2.01
γ^a	1.14	1.14
Me ^A	1.61	1.61
H6'	2.00	1.99
Me ^B	1.46	1.46
H6	1.34	1.33
H4	1.64	1.64
$\gamma^{a'}$	1.40	1.39
H2	1.21	1.21
H5	1.35	1.34
γ^c	1.25	1.25
$\gamma^{c'}$	1.25	1.25
H3	1.18	1.18

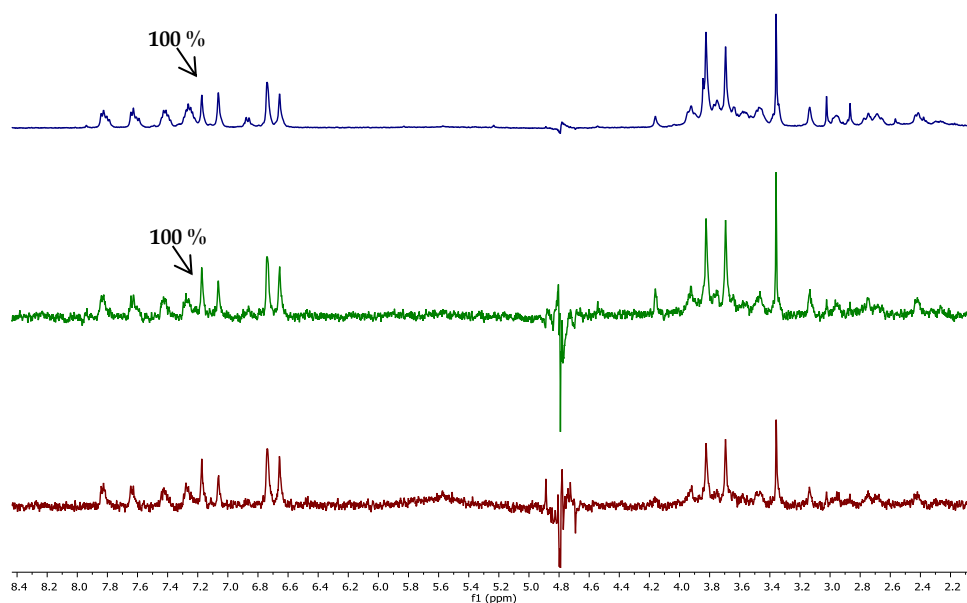


Figura 17 Espectros DF-STD del complejo β -L-man-Py- γ -(R)NH₃⁺]-Py-Ind/Poly(dA-dT)₂ (relación molar 1/0.05, [L] = 220 μ M) en D₂O, tampón fosfato a 25 °C. Espectro referencia con irradiación off-resonance, espectro azul. Espectro STD (ampliado 10 \times) irradiando a los protones H4', H5', H5'' de la desoxirribosa (región externa ADN), espectro verde. Espectro STD (ampliado 10 \times) irradiando al protón H1' de la desoxirribosa (región interna ADN), espectro rojo. En ambos espectros se marca con el 100%, aquellas señales que presentan la máxima saturación, Ind-3.

Tabla 4 Datos obtenidos de los experimentos STD de β -L-Man-Py- χ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) con Poly(dA-dT)₂ irradiando a 5.6 ppm. Los valores de las columnas Blanco y STD, corresponden a los valores de intensidades medidas del experimento control y del espectro STD respectivamente. El STD real se obtiene de la resta de ambas intensidades. El epítipo se obtiene del cálculo $I_{STD}/I_{STD\ max} \times 100$.

	L6=8 ZONA IRRADIADA: 5.6 (DENTRO)			
SEÑAL	BLANCO	STD	REAL STD	EPÍTOPO (% STD)
Ind-4	0.36	13.50	13.14	90
Ind-7	0.36	11.20	10.84	90
Ind-6	0.36	9.23	8.87	74
Ind-5	0.36	9.23	8.87	74
Ind-3	0.36	14.90	14.54	100
Py-5 ^A	2.43	9.23	6.80	74
Py-5 ^B + Py-3 ^B	1.66	12.30	10.64	74
Py-3 ^A	2.01	14.90	12.89	100
H1	0.48	8.39	7.91	67
$\gamma^a + \gamma^b$	1.50	7.63	6.13	31
Me ^A	2.21	6.30	4.09	61
H6'	1.50	5.21	3.71	35
Me ^B	1.80	8.39	6.59	19
H6	1.25	5.73	4.48	34
H4	1.13	6.30	5.17	28
γ^a	1.03	5.73	4.70	32
H2	1.03	9.23	8.20	62
H5	0.85	7.63	6.78	44
γ^c	1.37	7.63	6.26	55
$\gamma^{c'}$	1.37	7.63	6.26	55
H3	0.77	8.39	7.62	55

Tabla 5 Datos obtenidos de los experimentos STD de β -L-Man-Py- γ [(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) con Poly(dA-dT)₂ irradiando a 4.5 ppm. Los valores de las columnas Blanco y STD, corresponden a los valores de intensidades medidas del experimento control y del espectro STD respectivamente. El STD real se obtiene de la resta de ambas intensidades. El epítipo se obtiene del cálculo $I_{STD}/I_{STD\ max} \times 100$.

	L6=8		ZONA IRRADIADA: 4.5 (FUERA)	
SEÑAL	BLANCO	STD	REAL STD	EPÍTOPO (% STD)
Ind-4	1.13	12.3	11.17	81
Ind-7	1.03	11.2	10.17	73
Ind-6	1.03	10.2	9.17	66
Ind-5	1.03	7.63	6.6	48
Ind-3	1.03	14.9	13.87	100
Py-5 ^A	1.03	10.2	9.17	66
Py-5 ^B + Py-3 ^B	1.13	13.5	12.37	89
Py-3 ^A	1.66	14.9	13.24	95
H1	18	23.9	5.9	43
$\gamma^a + \gamma^b$	2.67	12.3	9.63	69
Me ^A	3.56	10.2	6.64	48
H6'	2.94	9.23	6.29	45
Me ^B	2.67	12.3	9.63	69
H6	3.56	8.39	4.83	35
H4	2.94	10.2	7.26	52
γ^a	3.91	6.93	3.02	22
H2	1.25	12.3	11.05	80
H5	1.25	9.23	7.98	58
γ^c	1.66	12.3	10.64	77
$\gamma^{c'}$	1.66	9.23	7.57	55
H3	2.67	11.2	8.53	61

Tabla 6 Parámetro numérico que define la orientación del ligando para el caso de β -L-Man-Py- χ (R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) con Poly(dA-dT)₂. La primera columna, valores obtenidos del cociente de los % STD normalizados obtenidos de la irradiación a 4.5 ppm (fuera) y a 5.6 ppm (dentro). La segunda columna, valores obtenidos del cociente de las intensidades sin normalizar.

SEÑAL	%STD _f / %STD _d	ORIENTACIÓN
		I _{fuera} /I _{dentro}
Ind-4	0.85	0.89
Ind-7	0.94	0.98
Ind-6	1.03	1.08
Ind-5	0.74	0.78
Ind-3	0.95	1.00
Py-5 ^A	1.35	1.41
Py-5 ^B + Py-3 ^B	1.16	1.22
Py-3 ^A	1.03	1.08
H1	0.75	0.78
$\gamma^a + \gamma^b$	1.57	1.65
Me ^A	1.62	1.70
H6'	1.70	1.78
Me ^B	1.46	1.53
H6	1.08	1.13
H4	1.40	1.47
$\gamma^{a'}$	0.64	0.67
H2	1.35	1.41
H5	1.18	1.23
γ^c	1.70	1.78
$\gamma^{c'}$	1.21	1.27
H3	1.12	1.17

Tablas con los valores de STD del derivado de D-manosa **3** con Poly(dG-dC)₂

Tabla 7 Datos obtenidos de los experimentos STD de β -D-Man-Py- η (R)NH₃⁺-l-Py-Ind (**3**) con Poly(dG-dC)₂ irradiando a 5.6 ppm. Los valores de las columnas Blanco y STD, corresponden a los valores de intensidades medidas del experimento control y del espectro STD respectivamente. El STD real se obtiene de la resta de ambas intensidades. El epítipo se obtiene del cálculo $I_{STD}/I_{STD\ max} \times 100$.

L6=8		ZONA IRRADIADA: 5.6 (DENTRO)		
SEÑAL	BLANCO	STD	REAL STD	EPÍTOPO (% STD)
Ind-4	0.19	5.73	5.55	74
Ind-7	0.19	7.63	7.45	100
Ind-6	0.19	6.30	6.12	82
Ind-5	0.19	5.21	5.03	67
Ind-3	0.19	4.74	4.56	61
Py-5 ^A	0.19	5.73	5.55	74
Py-5 ^B	0.19	7.63	7.45	100
Py-3 ^A	0.19	6.93	6.75	91
Py-3 ^B	0.19	5.21	5.03	67
H1+ γ^b	1.66	4.74	3.08	41
γ^a	1.51	6.30	4.79	64
Me ^A	1.66	3.91	2.25	30
H6'	1.37	3.23	1.86	25
Me ^B	1.37	4.74	3.37	45
H6	1.13	2.94	1.81	24
H4	0.70	5.73	5.03	67
$\gamma^{a'}$	0.70	5.21	4.51	60
H2	0.85	2.94	2.09	28
H5	0.77	3.23	2.46	33
γ^c	0.77	4.31	3.54	47
$\gamma^{c'}$	0.77	4.31	3.54	47
H3	0.94	2.67	1.73	23

Tabla 8 Datos obtenidos de los experimentos STD de β -D-Man-Py- γ -(R)NH₃⁺-I-Py-Ind (3) con Poly(dG-dC)₂ irradiando a 4.5 ppm. Los valores de las columnas Blanco y STD, corresponden a los valores de intensidades medidas del experimento control y del espectro STD respectivamente. El STD real se obtiene de la resta de ambas intensidades. El epítipo se obtiene del cálculo $I_{STD}/I_{STD\ max} \times 100$.

L6=8		ZONA IRRADIADA: 4.5 (FUERA)		
SEÑAL	BLANCO	STD	REAL STD	EPÍTOPO (% STD)
Ind-4	0.15	4.74	4.59	61
Ind-7	0.15	7.63	7.48	100
Ind-6	0.15	6.93	6.78	91
Ind-5	0.15	5.21	5.06	68
Ind-3	0.15	4.74	4.59	61
Py-5 ^A	0.15	6.30	6.15	82
Py-5 ^B	0.15	5.73	5.58	75
Py-3 ^A	0.15	5.21	5.06	68
Py-3 ^B	0.15	3.91	3.76	50
H1+ γ^b	10.20	14.90	4.70	63
γ^a	3.23	8.39	5.16	69
Me ^A	2.67	6.30	3.63	49
H6'	2.01	5.73	3.72	50
Me ^B	2.01	6.30	4.29	57
H6	2.01	4.74	2.73	37
H4	1.66	8.39	6.73	90
$\gamma^{a'}$	1.51	5.73	4.22	56
H2	1.03	4.31	3.28	44
H5	0.94	5.21	4.27	57
γ^c	0.70	5.21	4.51	60
$\gamma^{c'}$	0.70	5.21	4.51	60
H3	0.58	3.91	3.33	45

Tabla 9 *Parámetro numérico que define la orientación del ligando para el caso de β -D-Man-Py- χ (R)NH₃⁺]-Py-Ind (3) con Poly(dG-dC)₂. La primera columna, valores obtenidos del cociente de los % STD normalizados obtenidos de la irradiación a 4.5 ppm (fuera) y a 5.6 ppm (dentro). La segunda columna, valores obtenidos del cociente de las intensidades sin normalizar.*

SEÑAL	%STD _f / %STD _d	ORIENTACIÓN
		I _{fuera} /I _{dentro}
Ind-4	0.83	0.83
Ind-7	1.00	1.00
Ind-6	1.11	1.11
Ind-5	1.01	1.00
Ind-3	1.01	1.00
Py-5 ^A	1.11	1.11
Py-5 ^B	0.75	0.75
Py-3 ^A	0.75	0.75
Py-3 ^B	0.75	0.75
H1+ γ^b	1.53	1.52
γ^a	1.08	1.07
Me ^A	1.61	1.61
H6'	2.00	1.99
Me ^B	1.27	1.27
H6	1.51	1.50
H4	1.34	1.34
$\gamma^{a'}$	0.94	0.93
H2	1.57	1.57
H5	1.74	1.74
γ^c	1.27	1.27
$\gamma^{c'}$	1.27	1.27
H3	1.92	1.92

Tablas con los valores de STD del derivado de L-manosa **4** con Poly(dG-dC)₂

Tabla 10 Datos obtenidos de los experimentos STD de β -L-Man-Py- γ (R)NH₃⁺-Py-Ind (**4**) con Poly(dG-dC)₂ irradiando a 5.6 ppm. Los valores de las columnas Blanco y STD, corresponden a los valores de intensidades medidas del experimento control y del espectro STD respectivamente. El STD real se obtiene de la resta de ambas intensidades. El epítipo se obtiene del cálculo $I_{STD}/I_{STD\ max} \times 100$.

	L6=8 ZONA IRRADIADA: 5.6 (DENTRO)			
SEÑAL	BLANCO	STD	REAL STD	EPÍTOPO (% STD)
Ind-4	0.36	10.20	9.84	76
Ind-7	0.36	12.30	11.94	93
Ind-6	0.36	12.30	11.94	93
Ind-5	0.36	11.20	10.84	84
Ind-3	0.36	10.20	9.84	76
Py-5 ^A	2.43	14.90	12.47	97
Py-5 ^B + Py-3 ^B	1.66	10.20	8.54	66
Py-3 ^A	2.01	14.90	12.89	100
H1	0.48	4.74	4.26	33
$\gamma^a + \gamma^b$	1.50	9.23	7.73	60
Me ^A	2.21	10.20	7.99	62
H6'	1.50	4.74	3.24	25
Me ^B	1.80	7.63	5.83	45
H6	1.25	4.74	3.49	27
H4	1.13	8.39	7.26	56
γ^a	1.03	6.93	5.90	46
H2	1.03	3.91	2.88	22
H5	0.85	3.56	2.71	21
γ^c	1.37	10.20	8.83	69
γ^c	1.37	10.20	8.83	69
H3	0.77	3.23	2.46	19

Tabla 11 Datos obtenidos de los experimentos STD de β -L-Man-Py- γ -(R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) con Poly(dG-dC)₂ irradiando a 4.5 ppm. Los valores de las columnas Blanco y STD, corresponden a los valores de intensidades medidas del experimento control y del espectro STD respectivamente. El STD real se obtiene de la resta de ambas intensidades. El epítipo se obtiene del cálculo $I_{STD}/I_{STD\ max} \times 100$.

	L6=8		ZONA IRRADIADA: 4.5 (FUERA)	
SEÑAL	BLANCO	STD	REAL STD	EPÍTOPO (% STD)
Ind-4	1.13	9.23	8.1	53
Ind-7	1.03	13.5	12.47	81
Ind-6	1.03	12.3	11.27	73
Ind-5	1.03	11.3	10.27	67
Ind-3	1.03	10.2	9.17	60
Py-5 ^A	1.03	16.4	15.37	100
Py-5 ^B + Py-3 ^B	1.13	10.2	9.07	59
Py-3 ^A	1.66	13.5	11.84	77
H1	18	23.9	5.9	38
$\gamma^a + \gamma^b$	2.67	18	15.33	100
Me ^A	3.56	14.9	11.34	74
H6'	2.94	10.2	7.26	47
Me ^B	2.67	11.2	8.53	55
H6	3.56	9.23	5.67	37
H4	2.94	16.4	13.46	88
γ^a	3.91	9.23	5.32	35
H2	1.25	7.63	6.38	42
H5	1.25	8.39	7.14	46
γ^c	1.66	12.3	10.64	69
$\gamma^{c'}$	1.66	12.3	10.64	69
H3	2.67	7.63	4.96	32

Tabla 12 *Parámetro numérico que define la orientación del ligando para el caso de β -L-Man-Py- χ (R)NH₃⁺]-Py-Ind (4) con Poly(dA-dT)₂. La primera columna, valores obtenidos del cociente de los % STD normalizados obtenidos de la irradiación a 4.5 ppm (fuera) y a 5.6 ppm (dentro). La segunda columna, valores obtenidos del cociente de las intensidades sin normalizar.*

SEÑAL	%STD _f / %STD _d	ORIENTACIÓN
		I _{fuera} /I _{dentro}
Ind-4	0.82	0.69
Ind-7	1.04	0.88
Ind-6	0.94	0.79
Ind-5	0.95	0.79
Ind-3	0.93	0.78
Py-5 ^A	1.23	1.03
Py-5 ^B + Py-3 ^B	1.06	0.89
Py-3 ^A	0.92	0.77
H1	1.39	1.16
$\gamma^a + \gamma^b$	1.98	1.66
Me ^A	1.42	1.19
H6'	2.24	1.88
Me ^B	1.46	1.23
H6	1.62	1.36
H4	1.85	1.55
$\gamma^{a'}$	0.90	0.76
H2	2.22	1.86
H5	2.63	2.21
γ^c	1.20	1.01
$\gamma^{c'}$	1.20	1.01
H3	2.02	1.69